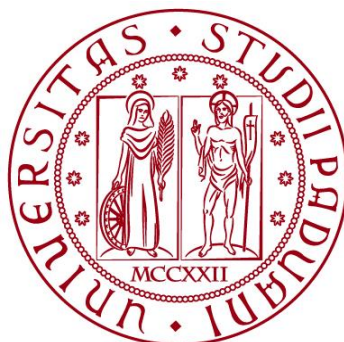


**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**DIPARTIMENTO DI BIOLOGIA**

**Corso di Laurea in Biologia Molecolare**



**ELABORATO DI LAUREA**

**LA TERMINAZIONE PREMATURA  
DELLA TRASCRIZIONE ALLE  
RIPETIZIONI GAA ESPANSE E LA  
POLIADENILAZIONE ALTERNATIVA  
ABERRANTE CONTRIBUISCONO AL  
DEFICIT TRASCRIZIONALE DELLA  
FRATASSINA NELL'ATASSIA DI  
FRIEDREICH**

**Tutor: Prof.ssa Antonella Russo  
Dipartimento di Medicina Molecolare**

**Laureanda: Anita Mazzariol**

**ANNO ACCADEMICO 2022/2023**

*A mio nonno Guido.*

*Immaginarti orgoglioso di me è stato il fuoco più grande che potesse ardere.*

## INDICE

<b>1. ABSTRACT</b> .....	1
<b>2. INTRODUZIONE</b>	
2.1 L'atassia di Friedreich.....	3
2.2 Cenni sul gene <i>FXN</i> e sulla fratassina.....	4
2.3 La formazione di <i>FXN-ett</i> .....	5
<b>3. MATERIALI E METODI</b>	
3.1 Linee cellulari utilizzate.....	7
3.2 qRT-PCR.....	7
3.3 Sequenziamenti.....	8
3.3.1 RNA-seq.....	9
3.3.2 ChIP-seq.....	9
3.3.3 PRO-seq.....	9
3.3.4 MACE-seq.....	10
3.4 Trattamento con oligonucleotidi antisenso (ASO).....	10
3.5 3' RACE.....	10
3.6 CRISPR-Cas9.....	11
<b>4. RISULTATI</b>	
4.1 Nelle cellule FRDA si ha il corretto reclutamento della RNA polimerasi II sul promotore di <i>FXN</i> .....	12
4.2 Le ripetizioni GAA espanse influenzano la transizione dall'inizio all'allungamento produttivo della trascrizione.....	12
4.3 La profilazione con RNA-seq rivela l'accumulo di RNA a monte dei GAA espansi in diversi tipi di cellule FRDA.....	13
4.4 L'espansione del trinucleotide GAA induce una terminazione aberrante della trascrizione.....	13
4.5 Il trascritto <i>FXN</i> terminato prematuramente subisce splicing alternativo.....	13
4.6 Il livello di <i>FXN-ett</i> è correlato alla lunghezza del più lungo dei due alleli GAA.....	14
4.7 <i>FXN-ett</i> è stabile ed espresso in diverse cellule e nei topi transgenici con FRDA.....	15
4.8 L'escissione dei GAA espansi mediante CRISPR-Cas9 ripristina l'espressione di <i>FXN</i> e diminuisce quella di <i>FXN-ett</i> .....	15
4.9 Il targeting con ASO dei GAA espansi diminuisce l'espressione di <i>FXN-ett</i> e aumenta quelli di <i>FXN</i> .....	15
<b>5. DISCUSSIONE</b> .....	16
<b>6. BIBLIOGRAFIA</b> .....	19
<b>7. APPENDICE</b> .....	20

## 1. ABSTRACT

Il deficit della proteina fratassina nell'atassia di Friedreich deriva dalla sottoregolazione trascrizionale del gene *FXN*, causata dall'espansione delle ripetizioni del trinucleotide intronico guanina-adenina-adenina (GAA).

Gli autori dell'articolo hanno utilizzato più approcci trascrittomici per determinare il processo molecolare alla base dell'inibizione della trascrizione dovuta a tali ripetizioni: è stato scoperto che la trascrizione di *FXN* nelle cellule dei pazienti viene terminata prematuramente a monte delle ripetizioni espanse, portando alla formazione di un RNA nuovo, troncato e stabile.

Tale trascritto *FXN* interrotto precocemente, detto *FXN* early terminated transcript (*FXN-ett*), subisce splicing alternativo non produttivo, non contribuendo alla sintesi della fratassina funzionale; inoltre, il livello dell'RNA *FXN-ett* è direttamente correlato alla lunghezza del più lungo dei due tratti GAA espansi.

Il targeting di GAA con oligonucleotidi antisenso o l'escissione delle ripetizioni elimina l'impedimento alla trascrizione, diminuendo così l'espressione del trascritto aberrante *FXN-ett* e aumentando i livelli di mRNA *FXN* e di fratassina.

La trascrizione non produttiva può rappresentare un fenomeno comune, e quindi un bersaglio terapeutico nelle malattie causate da aberrazioni trascrizionali mediate da ripetizioni.



## 2. INTRODUZIONE

### 2.1 L'atassia di Friedreich

L'atassia di Friedreich (FRDA) è una malattia genetica neurologica degenerativa, i cui sintomi iniziali si manifestano tipicamente tra i 10 e i 16 anni di età, anche se esiste una percentuale di casi con esordio tardivo: Late Onset Friedreich Ataxia (LOFA), o molto tardivo: Very Late Onset Friedreich Ataxia (VLOFA), rispettivamente dopo i 25 e i 40 anni (Cook A. & Giunti P., 2017).

I sintomi neurologici possono includere cadute frequenti, una postura instabile e una progressiva difficoltà a camminare, dovuta alla ridotta capacità di coordinare i movimenti volontari dei muscoli (atassia). Gli individui affetti spesso sviluppano un linguaggio confuso a causa del coinvolgimento dei muscoli della bocca e della gola, deformità caratteristiche del piede e una curvatura irregolare della colonna vertebrale. L'atassia di Friedreich è anche associata a cardiomiopatia in più della metà delle persone affette, che può portare a insufficienza cardiaca o irregolarità del ritmo cardiaco; al diabete mellito, che si sviluppa in circa un terzo delle persone con FRDA; e a perdita della vista e dell'udito (Cook A. & Giunti P., 2017).

Sono inoltre presenti lievi deficit cognitivi che coinvolgono vari campi, tra cui l'attenzione, la velocità e la memoria di lavoro (Cook A. & Giunti P., 2017).

Non esistono terapie efficaci per tale patologia, dunque si osserva un avanzamento delle caratteristiche cliniche che porta le persone affette da FRDA ad utilizzare inizialmente ausili per la deambulazione, per poi richiedere, generalmente entro 10-20 anni, l'uso della sedia a rotelle (Cook A. & Giunti P., 2017).

La progressione dei sintomi è variabile tra gli individui affetti, alcuni dei quali, con sintomatologia meno grave, possono vivere fino a sessant'anni o più; tuttavia, l'aspettativa media di vita è pari a 36,5 anni (Cook A. & Giunti P., 2017).

L'atassia di Friedreich è una malattia autosomica recessiva, cioè legata ai cromosomi autosomici, che si manifesta solo qualora l'individuo presenti entrambi gli alleli mutati per il determinato gene coinvolto (Cook A. & Giunti P., 2017).

Colpisce una persona ogni 50.000, ed è la forma di atassia più comune in Europa; tuttavia, la frequenza di portatori sani, ovvero persone che presentano una copia dell'allele alterato, corrisponde a un individuo ogni 85,26 (Cook A. & Giunti P., 2017).

Il gene coinvolto è *FXN*, che nella maggior parte delle persone con FRDA (circa il 96%) presenta in entrambe le copie un'espansione del trinucleotide guanina-adenina-adenina (GAA); mentre nell'1-3% dei casi si ha la presenza dell'espansione GAA in un allele, e una mutazione puntiforme o delezione nell'altro. Nonostante nei loci *FXN* di individui non affetti siano tipicamente presenti solo poche ripetizioni GAA, nei genotipi con la patologia questo tratto si espande in centinaia di copie, e può raggiungerne fino a circa 1700.

È stata inoltre evidenziata una relazione inversamente proporzionale tra la lunghezza delle ripetizioni GAA e l'età di manifestazione dei sintomi: i soggetti con malattia ad esordio precoce sono associati a ripetizioni GAA più estese, ad un fenotipo più grave, ad una progressione della patologia più rapida e ad una maggiore incidenza di complicanze cardiache (Cook A. & Giunti P., 2017).

## 2.2 Cenni sul gene *FXN* e sulla fratassina

Il gene *FXN* mappa sul cromosoma 9, è costituito da 5 esoni e codifica per una proteina mitocondriale chiamata fratassina.

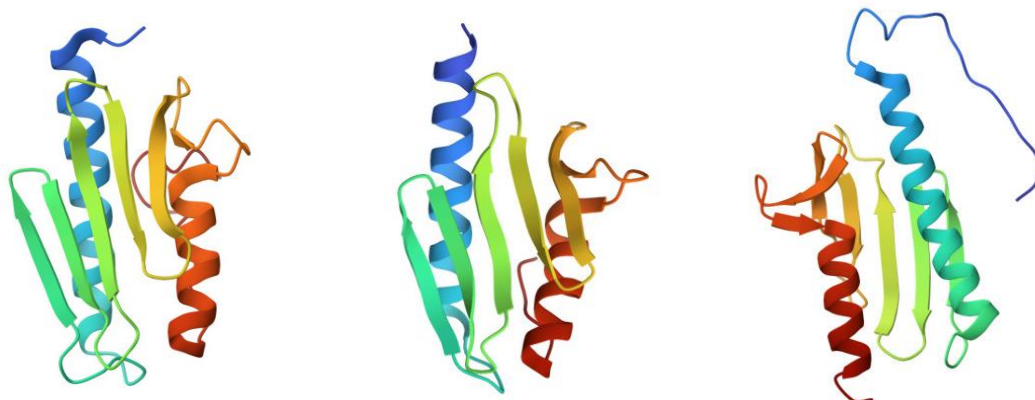
La fratassina è una proteina altamente conservata, che viene codificata nel nucleo e poi espressa a livello del citoplasma come polipeptide precursore di 210 aminoacidi (23 kDa), che viene trasportato nei mitocondri grazie ad una sequenza target all’N-terminale (Schmucker, Stéphane et al., 2008).

Nei mitocondri il precursore della fratassina subisce un processo di maturazione mediante due passaggi, in cui viene processato mediante tagli proteolitici da parte dell’enzima peptidasi di elaborazione mitocondriale (MPP). Il primo taglio avviene tra i residui Gly41 e Leu42, generando una forma intermedia della proteina detta *i-FXN*, di 19 kDa; mentre il secondo taglio avviene in corrispondenza del residuo Ser81, portando alla formazione di *m81-FXN*, di 14,2 kDa, che corrisponde alla forma matura della fratassina umana (Schmucker, Stéphane et al., 2008).

La funzione esatta di questa proteina è ancora oggetto di studio; tuttavia, sembra che questa abbia un ruolo in diverse reazioni biochimiche:

- 1) Agisce come fattore che controlla lo stress ossidativo cellulare moderando la concentrazione delle specie reattive dell’ossigeno (ROS);
- 2) È responsabile dell’accumulo del ferro durante le condizioni di sovraccarico di questo elemento;
- 3) Agisce come partecipante attivo in percorsi che coinvolgono la conversione dell’energia e la fosforilazione ossidativa;
- 4) Opera come chaperone del ferro nella biogenesi dell’eme e dei cluster Fe-S (ISC), motivo strutturale di alcune metalloproteine per esempio i complessi I, II e III della catena di trasporto degli elettroni;
- 5) Rappresenta un aiuto nella riparazione dei cluster Fe-S dell’aconitasi (un enzima essenziale nel ciclo di Krebs) danneggiati dall’ossidazione (Bencze, Krisztina Z. et al., 2006).

Esiste un elevato grado di omologia strutturale nelle proteine ortologhe di fratassina: dai batteri (CyaY), ai lieviti (Yfh1), all’uomo (HsFtx) (**Figura 1**).



**Figura 1.** Struttura cristallografica della fratassina umana wild-type (HsFtx) a sinistra, dell’ortologa batterica (CyaY) in *Escherichia coli* al centro, dell’ortologa di lievito (Yfh1) in *Saccharomyces cerevisiae* a destra (liberamente tratto dal database Protein Data Bank statunitense: RCSB PDI).

Presenta una struttura globulare resa compatta da una rete idrofobica, e composta da due  $\alpha$ -eliche posizionate a formare un piano, cinque foglietti-  $\beta$  antiparalleli disposti a formare un secondo piano, e un sesto filamento (e un settimo in HsFtx) che interseca gli altri piani formandone un altro, con una topologia globale rappresentata da:  $\alpha 1\beta 1\beta 2\beta 3\beta 4\beta 5\beta 6(\beta 7)\alpha 2$  (Schmucker, Stéphane et al., 2008).

In particolare, la presenza di una dozzina di residui acidi in corrispondenza dell'elica  $\alpha 1$  e del foglietto  $\beta 1$ , sembra essere cruciale per il legame della fratassina con il ferro (Schmucker, Stéphane et al., 2008).

Nei pazienti affetti da FRDA, l'espansione del trinucleotide GAA all'interno dell'introne 1 porta ad una carenza di fratassina, con conseguente diminuzione della produzione dell'eme e dei cluster Fe-S, riduzione dell'attività degli enzimi contenenti ISC, accumulo di ferro mitocondriale e progressiva interruzione dell'omeostasi del ferro cellulare (Bencze, Krisztina Z. et al., 2006).

È possibile che la compromessa biosintesi dei cluster Fe-S associati alla carenza di fratassina inducano un aumento dell'importazione di ferro mitocondriale nel tentativo di aumentare la sintesi di ISC. Questo facilita i problemi legati all'incapacità di processare il ferro reattivo già presente, aumentando ulteriormente i livelli di ROS e quindi di stress ossidativo, portando ad un graduale danno cellulare e infine alla perdita di vitalità cellulare (Bencze, Krisztina Z. et al., 2006). Le persone affette dalla patologia mostrano dunque una lenta progressione dei sintomi muscolari e neurologici legata all'interruzione della corretta regolazione del ferro (Cook A. & Giunti P., 2017).

### 2.3 La formazione di *FXN-ett*

La causa dell'atassia di Friedreich è la sottoregolazione dell'espressione di *FXN*, legata alla presenza dell'espansione trinucleotidica GAA, che rappresenta un ostacolo alla trascrizione del gene.

Gli autori dell'articolo discusso in questa tesi vogliono fare chiarezza sui meccanismi molecolari alla base di tale impedimento, considerando che contrariamente ad altri disturbi legati all'espansione ripetuta, nei campioni FRDA non è stata rilevata una ritenzione degli introni, suggerendo quindi che venga compromesso l'attraversamento dei GAA espansi da parte della RNA polimerasi II (Pol II), piuttosto che le fasi successive alla trascrizione.

Attraverso diverse metodiche, gli autori hanno rilevato l'effettivo reclutamento della RNA polimerasi II sul promotore e la presenza di una zona di terminazione prematura della trascrizione all'interno dell'introne 1, a monte dei GAA espansi, che porta alla sintesi di un trascritto breve, stabile e giuntato in modo aberrante, denominato *FXN* early terminated transcript (*FXN-ett*) (**Figura 2**).

Nelle cellule FRDA si osservano inoltre delle modifiche istoniche tipiche del DNA non attivo trascrizionalmente (istone H3K9me3), localizzate nelle regioni a monte e a valle delle ripetizioni, senza però interferire con la regione promotoriale e il sito di inizio della trascrizione (TSS) di *FXN*.

Inoltre, è stato rilevato un aumento della metilazione CpG in una regione differenzialmente metilata (DMR) nell'introne 1 del gene, a monte delle espansioni GAA, senza però che venga compromessa la regione promotoriale.

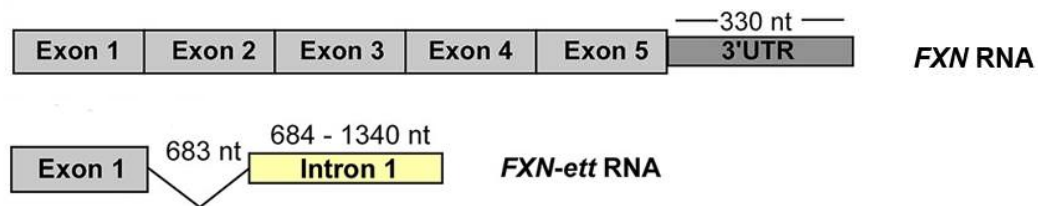


Questa DMR si estende su 10 CpG (~200 bp) immediatamente a monte del sito accettore di *FXN-ett* riconosciuto dal macchinario di splicing, e risulta ipermetilata nei pazienti con FRDA rispetto ai controlli non affetti; in particolare, questa regione si sovrappone a marcatori della cromatina non attiva trascrizionalmente e alla presenza di strutture a triplo filamento ibride DNA-RNA, dette R-loop, rappresentando probabilmente un grande blocco all'allungamento trascrizionale (Rodden Layne N et al., 2021).

L'insieme di queste affermazioni suggerisce che la trascrizione venga avviata in modo meno efficiente, e che gli eventi a valle del TSS siano responsabili del deficit trascrizionale che coinvolge il gene *FXN*.

Gli autori hanno inoltre rilevato come l'escissione e l'interferenza con le espansioni trinucleotidiche aumentino significativamente la trascrizione dell'mRNA di *FXN* e limitino quella di *FXN-ett*.

Questi risultati possono fornire un ulteriore ausilio nella comprensione dei processi molecolari alla base dell'ataxia di Friedreich, con la speranza di sviluppare nuovi strumenti terapeutici con i quali trattare questa rara malattia genetica.



**Figura 2.** Illustrazione schematica del trascritto *FXN* canonico (in alto) e del trascritto terminato prematuramente *FXN-ett* (in basso) (liberamente tratto dall'articolo oggetto di discussione di questa tesi).

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 Linee cellulari utilizzate

Negli esperimenti presentati nell'articolo sono state utilizzate le seguenti linee cellulari:

- Linee di fibroblasti primari umani: sono stati utilizzati sia i fibroblasti primari FRDA che i fibroblasti di controllo (wild-type) ottenuti da materiale bioptico; e sono stati maneggiati seguendo un protocollo approvato dall'Institutional Review Board (IRB) presso l'Università dell'Alabama a Birmingham.
- Linee di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC): sono cellule ottenute dalla riprogrammazione dei fibroblasti mediante un protocollo, anch'esso approvato dall'Institutional Review Board (IRB) presso l'Università dell'Alabama a Birmingham. Anche in questo caso sono state utilizzate cellule di controllo e FRDA che presentassero espansioni in circa 600 copie e una ridotta espansione di mRNA *FXN* rispetto alle cellule di controllo, indicate con la sigla "CTRL1". Le cellule iPS FRDA1 e CTRL1 sono state ottenute utilizzando l'espressione retrovirale di fattori di riprogrammazione, in particolare trasducendo i fibroblasti con vettori retrovirali che codificano per i fattori di trascrizione Oct3/4, Sox2, Klf4 e c-Myc. Invece, le cellule FRDA2 e FRDA3 sono state riprogrammate mediante l'utilizzo di vettori virali derivati dal virus Sendai, trasducendo le colture di fibroblasti con i virus CytoTune™ 2.0 KOS, CytoTune™ 2.0 c-Myc e CytoTune™ 2.0 Klf4.

#### 3.2 qRT-PCR

La qRT-PCR, ovvero la PCR retro-trascrizionale quantitativa, è stata utilizzata dagli autori dell'articolo per misurare l'espressione dell'mRNA di *FXN* e del trascritto *FXN-ett* nelle cellule FRDA1, CTRL1, FRDA2, FRDA3 e nei fibroblasti primari FRDA e di controllo.

La PCR è una metodologia che consente l'amplificazione in vitro di un segmento definito di DNA (che prenderà il nome di amplicone) in modo da ottenerne una quantità sufficiente per le analisi. Si basa sul meccanismo di replicazione del DNA, in cui la DNA polimerasi estende l'elica in direzione 5'-3' a partire da un breve innesco di RNA o DNA, copiando il filamento stampo.

Con la PCR quantitativa (o real-time PCR) è possibile monitorare ciclo per ciclo di amplificazione la quantità di amplicone prodotto nella miscela di reazione, monitorando un cambiamento di fluorescenza legato alla produzione dell'amplicone stesso, consentendo di stabilire una correlazione tra il numero di cicli di amplificazione necessari affinché il prodotto di PCR diventi rilevabile e la quantità di DNA stampo presente inizialmente nel campione. Esistono essenzialmente due metodi di real-time PCR: mediante l'utilizzo di una sostanza fluorescente, come il SYBR Green, in grado di legarsi selettivamente alla doppia elica di DNA diventando fluorescente; oppure mediante l'utilizzo di sonde che recano dei reporter fluorescenti. Questo secondo metodo si basa sul processo di fluorescence resonant energy transfer (FRET), che avviene quando uno dei due fluorofori in stretta prossimità, detto reporter, emette fluorescenza che può essere assorbita eccitando un secondo fluoroforo, detto quencher.

Nel caso specifico dell'articolo è stata misurata l'espressione dei trascritti, e quindi è stata adottata una PCR retro-trascrizionale: prima della PCR vera e propria viene introdotta una fase di retrotrascrizione in cui l'enzima trascrittasi inversa, a partire da un primer, sintetizza un singolo filamento di DNA complementare (cDNA) a partire dal filamento di RNA stampo; in questo modo la PCR può essere utilizzata anche per amplificare molecole di RNA.

In particolare, gli autori dell'articolo trattato in questa tesi hanno svolto tutte le reazioni di qRT-PCR in triplicato ed hanno utilizzato come sostanza fluorescente il SYBR Green, includendo sempre reazioni di controllo senza trascrittasi inversa (No-RT) per valutare la quantità di contaminazione di DNA nel campione di RNA.

### **3.3 Sequenziamenti**

I sequenziamenti utilizzati dagli autori dell'articolo sono:

- Il sequenziamento Sanger (detto anche metodo della terminazione della catena): è un sequenziamento di prima generazione che necessita dell'espansione dei frammenti da sequenziare tramite crescita di colonie batteriche, e dell'allestimento di una PCR. Per la PCR viene utilizzata una miscela costituita da deossiribonucleosidi trifosfato (dNTP) e una bassa concentrazione di dideossiribonucleosidi trifosfato (ddNTP) marcati, i quali sono privi del gruppo 3'-OH necessario per la formazione del legame fosfodiesterico. Nella fase di estensione della PCR la DNA polimerasi incorpora casualmente un ddNTP, impedendo così l'incorporazione di altri nucleotidi alla catena in crescita. Si ottengono alla fine milioni o miliardi di copie della sequenza di DNA di interesse, che però terminano a lunghezze diverse e casuali.

Lo schema originario di questa metodologia prevede la realizzazione di 4 miscele di reazione separate, ognuna contenente uno dei quattro ddNTP.

Successivamente alla reazione di sintesi, i frammenti vengono separati in base alle dimensioni mediante l'elettroforesi in gel di poliacrilamide (in grado di separare frammenti che differiscono anche per una sola base) e leggendo le bande del gel dalla più piccola alla più grande è possibile determinare la sequenza 5'-3' del filamento di DNA di partenza.

Un'altra procedura prevede invece la creazione di un'unica miscela contenente tutti e quattro i ddNTP, ognuno marcato con un fluorocromo diverso. In questo modo è possibile effettuare un'unica reazione di sequenziamento poiché i frammenti, sottoposti a elettroforesi su gel di poliacrilamide effettuata utilizzando un capillare, passano durante la migrazione attraverso un raggio laser. Questo consente di eccitare il fluorocromo di ciascun frammento, la cui fluorescenza emessa viene registrata da un rilevatore della fluorescenza. Attraverso software specifici è poi possibile ricostruire la sequenza, ottenendo un elettroferogramma dove è mostrato il picco di fluorescenza di ogni nucleotide lungo la catena del DNA stampo.

- Il sequenziamento Illumina: è un sequenziamento di seconda generazione che consente (a differenza del sequenziamento Sanger) di sequenziare più campioni di DNA senza dover prima clonarli all'interno di vettori. I campioni vengono frammentati casualmente e poi vengono legati con degli adattatori, che consentono ai frammenti di aderire ad un supporto solido con entrambe le estremità. In seguito viene allestita la reazione di amplificazione mediante Bridge PCR, al termine della

quale potrà avvenire il “sequenziamento mediante sintesi” (sequencing by synthesis) attraverso l’uso di ddNTP, ognuno marcato con un fluoroforo diverso. Ogni volta che un ddNTP viene incorporato nel filamento (mediante la DNA polimerasi) si effettua la lettura della fluorescenza, fino a ricostruire l’intera sequenza nucleotidica.

### **3.3.1 RNA-seq**

La RNA-seq (o RNA sequencing) è una tecnica che si propone di analizzare la struttura dei trascritti ed il loro livello di espressione tramite il sequenziamento del cDNA double strand ottenuto dalla retrotrascrizione dell’RNA messaggero.

L’RNA per il sequenziamento viene estratto seguendo degli step che prevedono di: separare l’RNA dal DNA genomico; separare l’mRNA dagli altri RNA; rimuovere il DNA genomico contaminante mediante l’utilizzo di DNAsi; utilizzare inibitori delle RNAsi per impedire che il materiale di interesse venga degradato; controllare la qualità dell’RNA per poi frammentarlo; sintetizzare il cDNA ed infine il sequenziarlo. Le informazioni sull’espressione genica vengono ottenute sulla base del numero di volte che un trascritto viene sequenziato.

Nel caso specifico dell’articolo discusso in questa tesi, gli autori hanno svolto analisi di RNA-seq per studiare i livelli di espressione dei trascritti *FXN* e *FXN-ett* all’interno delle diverse linee cellulari.

### **3.3.2 ChIP-seq**

La metodica ChIP-seq combina il sequenziamento di prossima generazione con la tecnica di immunoprecipitazione della cromatina (ChIP).

Questa tecnica viene adoperata per investigare le interazioni proteina-DNA in vivo all’interno della cellula, con lo scopo di determinare se una certa proteina si associa direttamente con una certa regione genomica.

La procedura prevede di legare covalentemente tutte le proteine che si trovano a stretto contatto con il DNA per poi trattare i complessi DNA-proteina in maniera che il DNA venga frammentato, per esempio mediante sonicazione. I frammenti di DNA legati alla proteina di interesse vengono poi selettivamente immunoprecipitati utilizzando un anticorpo prodotto contro la proteina di interesse. Il DNA e la proteina precipitati vengono sottoposti ad un trattamento specifico per revertire i legami covalenti ed in seguito vengono separati tramite un trattamento apposito, ad esempio mediante la miscela fenolo-cloroformio. Infine, si procede analizzando il DNA di interesse per verificarne la presenza e/o le caratteristiche.

In particolare, gli autori dell’articolo hanno utilizzato questa metodica per determinare lo stato trascrizionale del locus *FXN*, utilizzando un anticorpo specifico per la RNA polimerasi II; seguita dal sequenziamento di seconda generazione Illumina.

### **3.3.3 PRO-seq**

La PRO-seq (Run-on sequencing) è un sequenziamento nucleare di precisione che permette di mappare la posizione della RNA polimerasi II con una risoluzione di singola base. Questa metodica prevede l’utilizzo di nucleotidi biotinilati che una volta inseriti nel filamento di RNA in crescita ne arrestano l’ulteriore allungamento.

I filamenti sintetizzati vengono quindi estratti, frammentati, purificati, ligati con adattatori alle estremità 3' e 5', amplificati mediante RT-PCR e in seguito sequenziati.

Questa tecnica è stata adoperata negli esperimenti presentati nell'articolo per valutare nel dettaglio la progressione della trascrizione attraverso il locus *FXN* in presenza di un inibitore dell'inizio della trascrizione, ovvero il triptolide (TRP), e un inibitore dell'allungamento, il flavopiridolo (FP).

### **3.3.4 MACE-seq**

La MACE-seq (Massive Analysis of cDNA ends) è una tecnica che consente l'analisi massiva delle estremità del cDNA, unita al sequenziamento mediante sequenziatori di Next Generation Sequencing.

In particolare, permette di rilevare l'espressione genica differenziale e la poliadenilazione alternativa nelle molecole di mRNA. Differisce dalla RNA-seq poiché viene generata una singola lettura per molecola di trascrizione, consentendo l'identificazione di trascritti brevi e/o rari ad una profondità di sequenziamento inferiore rispetto alla RNA-seq.

Gli autori hanno utilizzato questa tecnica per approfondire le analisi di RNA-seq e PRO-seq, nonché per identificare nuove trascrizioni e segnali di poliadenilazione alternativa (APA) relativamente al locus *FXN*; successivamente, è stato eseguito il sequenziamento Illumina.

### **3.4 Trattamento con oligonucleotidi antisenso (ASO)**

Gli oligonucleotidi antisenso (ASO) sono brevi sequenze nucleotidiche sintetiche a singolo filamento di DNA o RNA in grado di legarsi in maniera specifica ad un mRNA bersaglio, inducendone la degradazione e quindi inibendo la sintesi della proteina corrispondente; oppure ad un pre-mRNA bersaglio, modulandone ad esempio lo splicing.

Nel caso dell'articolo è stato effettuato il targeting con oligonucleotidi antisenso specifici per le ripetizioni GAA in modo da interferire con le eventuali strutture di DNA e/o DNA-RNA presenti in tale regione e quindi ridurre l'ostacolo nella trascrizione del gene *FXN*. In particolare, è stata effettuata la trasfezione di fibroblasti primari FRDA con Gap17 gapmer ASO, i quali presentano porzione centrale di DNA fiancheggiata da RNA chimicamente modificato, che aumenta l'affinità di legame per la sequenza bersaglio. In seguito è stata misurata l'espressione dei trascritti *FXN* e *FXN-ett*.

### **3.5 3'-RACE**

La tecnica RACE (rapid amplification of 5' or 3' cDNA) è una tecnica di amplificazione come la PCR che, usando come stampo mRNA retrotrascritto in cDNA, permette di amplificare le estremità ignote al 3' o al 5' della molecola di RNA messaggero a partire da una sequenza nota. A seconda dell'estremità che si vuole recuperare si distingue in 5'-RACE e 3'-RACE. Nel primo caso viene utilizzato un primer complementare ad una sequenza nota ed un secondo primer, di solito complementare ad un'altra sequenza nota aggiunta appositamente al 5'. Nel secondo caso si adopera sempre un primer complementare ad una sequenza già nota

mentre, per la creazione del secondo primer, si sfrutta la sequenza terminale poliadeniata al 3', tipica degli mRNA eucariotici.

Gli autori dell'articolo trattato in questa tesi hanno sfruttato l'approccio 3'-RACE per confermare l'espressione e determinare la sequenza della trascrizione breve e terminata prematuramente, utilizzando un primer specifico per il gene *FXN* e un secondo primer per l'estremità 3'; la sequenza è poi stata determinata clonando singoli prodotti di PCR estratti da gel in un vettore di clonazione TA in cellule One Shot® Mach1™-T1R di *Escherichia coli*, per poi eseguire il sequenziamento Sanger.

### **3.6 CRISPR-Cas9**

CRISPR/Cas9 è una tecnologia di editing genetico che coinvolge due componenti essenziali: un RNA guida che si appaia ad un gene bersaglio desiderato e Cas9, un'endonucleasi in grado di causare una rottura del DNA a doppio filamento riconoscendo una sequenza presente nell'RNA guida, consentendo modifiche al genoma apportando tagli in siti specifici.

Nel caso circoscritto agli esperimenti presentati dall'articolo, questa tecnica è stata utilizzata per la rimozione dei tratti GAA intronici su entrambi gli alleli *FXN*, per misurare poi l'espressione dei trascritti *FXN* e *FXN-ett* all'interno dei diversi tipi cellulari.

## 4. RISULTATI

### 4.1 Nelle cellule FRDA si ha il corretto reclutamento della RNA polimerasi II sul promotore di *FXN*

Svolgendo un'analisi ChIP-seq nelle cellule CTRL1 e FRDA1 mediante l'utilizzo di un anticorpo specifico per la Pol II totale, gli autori hanno rilevato un'occupazione simile della regione del promotore da parte della RNA polimerasi II, suggerendo come il reclutamento dell'apparato trascrizionale non venga compromesso nelle cellule affette dalla malattia; infatti, la regione del promotore necessaria ad un'efficiente trascrizione del gene è occupata da Pol II in entrambe le tipologie cellulari. Tuttavia, nelle cellule di controllo si osserva una regione aggiuntiva di circa 70 bp a livello dell'introne 1 (si veda **Figura 1E** dell'articolo riportato in appendice), che potrebbe rappresentare il punto che indica il passaggio dall'inizio all'allungamento della trascrizione, concesso solo alle cellule prive di espansioni GAA.

### 4.2 Le ripetizioni GAA espanse influenzano la transizione dall'inizio all'allungamento produttivo della trascrizione

Il dominio C-terminale (CTD) della RNA polimerasi II presenta delle ripetizioni (52 nell'uomo) dalla sequenza YSPTSPS. All'interno di tali ripetizioni i singoli residui aminoacidici possono essere fosforilati, glicosilati o subire isomerizzazioni cis-trans della prolina. Queste modificazioni hanno un ruolo nel determinare il legame al CTD di fattori proteici, modulando così la trascrizione. In particolare, studi su *Saccharomyces cerevisiae* rivelano che la presenza di Pol II fosforilata a livello della serina 5 è localizzata nei promotori ed è probabilmente importante per la dissociazione di fattori specifici dell'inizio della trascrizione; mentre, la fosforilazione a livello della serina 2 avviene principalmente durante l'allungamento o la terminazione della trascrizione e potrebbe fungere da sito di riconoscimento per fattori coinvolti in queste fasi (Komarnitsky P. et al., 2000). Dunque, determinare la presenza di Pol II fosforilata a livello della serina 5 (S5P) e della serina 2 (S2P) del dominio C-terminale rappresenta un indicatore di trascrizione attiva, tra la fase di inizio e quella di allungamento.

Gli studi mediante ChIP-seq eseguiti dagli autori hanno rilevato come nelle cellule dei pazienti affetti da atassia di Friedreich ci siano significative diminuzioni dei segnali Pol II S5P e S2P sul promotore *FXN* (si veda **Figura 1G** dell'articolo riportato in appendice), indicando come le ripetizioni GAA espanse situate a valle del promotore siano coinvolte nel passaggio del complesso di trascrizione da immaturo a maturo, e quindi trascrizionalmente attivo nella fase di allungamento.

Gli autori hanno anche condotto analisi PRO-seq per comprendere più nel dettaglio la progressione della trascrizione lungo il locus *FXN*, utilizzando inibitori dell'inizio della trascrizione [triptolide (TRP)] e dell'allungamento [flavopiridolo (FP)].

Il trattamento con FP ha dimostrato che la trascrizione di *FXN* viene avviata attivamente sia nelle cellule FRDA che CTRL, anche se in quelle di controllo è stato rilevato un segnale PRO-seq maggiore; mentre, il trattamento con TRP ha portato ad un accumulo di sequenze in una regione di terminazione della trascrizione

(3'UTR) di *FXN* in entrambe le tipologie cellulari, nonostante sia stato rilevato un segnale duraturo all'interno dell'introne 1 esclusivamente nelle cellule FRDA. L'insieme di queste analisi suggerisce un'importante inibizione della progressione da parte di Pol II, oppure una terminazione prematura della trascrizione all'interno dell'introne 1 contenente GAA espansi.

#### **4.3 La profilazione con RNA-seq rivela l'accumulo di RNA a monte dei GAA espansi in diversi tipi di cellule FRDA**

L'analisi dei dati RNA-seq ottenuti da iPSC FRDA1 e CTRL1 e da fibroblasti primari FRDA e CTRL ha rilevato, anche in questo caso, un accumulo di sequenze nell'introne 1, principalmente a monte delle espansioni GAA, nelle cellule FRDA. Anche dalle cellule di controllo è emersa la presenza di sequenze introniche, ma in numero inferiore (si veda **Figure 2C e 2D** dell'articolo riportato in appendice).

#### **4.4 L'espansione del trinucleotide GAA induce una terminazione aberrante della trascrizione**

Effettuando un'analisi MACE-seq profonda di iPSC CTRL1 e FRDA1, gli autori hanno rilevato un forte segnale di poliadenilazione (PA) al 3'UTR, che si trova a circa 350 nucleotidi a valle dal codone di stop.

Tale segnale si osserva in corrispondenza della terminazione dell'mRNA di *FXN* canonico a lunghezza intera; tuttavia, nelle cellule FRDA è stato rilevato un segnale a monte delle espansioni GAA, di intensità paragonabile al segnale del sito 3'UTR (si veda **Figura 3B** dell'articolo riportato in appendice).

Le analisi bioinformatiche dei dati MACE-seq hanno definito il picco a monte dei GAA come un segnale di poliadenilazione alternativa (APA), confermando la presenza di un breve trascritto poliadenilato che termina prematuramente a monte dei GAA, accumulato preferenzialmente nelle cellule FRDA.

È stato rilevato un trascritto antisenso poliadenilato di *FXN*, detto *FAST-1*. La sua sovraespressione in fibroblasti FRDA e di controllo diminuisce l'espressione di *FXN* principalmente nelle cellule FRDA, mentre il suo abbattimento aumenta significativamente l'espressione del gene nelle cellule FRDA (Mikaeili, Hajar et al., 2018). Alla luce di questo, gli autori hanno verificato la direzionalità delle trascrizioni all'interno del locus *FXN*, non rilevando alcuna sequenza derivata dal filamento inverso, confermando come la trascrizione terminata prematuramente a monte dei GAA sia nella stessa direzione dell'mRNA *FXN* canonico.

#### **4.5 Il trascritto *FXN* terminato prematuramente subisce splicing alternativo**

Per confermare l'espressione del trascritto *FXN-ett*, gli autori hanno utilizzato l'approccio 3'RACE.

Nelle cellule CTRL è stato identificato un singolo prodotto predominante al 3' di lunghezza pari a circa 900 bp che corrisponde a quella attesa per l'mRNA canonico di *FXN*. Mentre analisi 3'RACE effettuate in più linee cellulari FRDA hanno rivelato un ulteriore prodotto PCR di circa 700 bp, oltre a quello di circa 900 bp. La lunghezza di questo nuovo prodotto è circa la metà di quella prevista, considerando che la distanza tra l'inizio dell'introne 1 e il primo GAA è 1339 bp, e che la poliadenilazione alternativa avviene a monte delle ripetizioni GAA.



In seguito gli autori dell'articolo hanno effettuato un sequenziamento Sanger, rivelando che il trascritto più lungo di circa 900 bp rappresenta prevalentemente mRNA *FXN* canonico, costituito da tutti e 5 gli esoni.

Mentre dal sequenziamento del trascritto più breve di circa 700 bp, presente nelle cellule FRDA, è emerso che questo codifica RNA contenente l'esone 1 e un frammento dell'introne 1. La parte intronica di questa trascrizione infatti, manca dei primi 683 nucleotidi subito a valle dell'estremità dell'esone 1, chiarendo così la differenza in lunghezza del prodotto di PCR previsto (circa 1400 bp) e ottenuto dalla trascrizione terminata prematuramente (circa 700 bp). Tale risultato suggerisce che il trascritto *FXN-ett* subisca splicing alternativo responsabile della rimozione dei 683 nucleotidi.

L'esame dei dati RNA-seq delle iPSC FRDA ha rivelato letture di sequenze risultanti dall'evento di splicing alternativo, che utilizza come sito donatore quello di giunzione canonico tra esone 1 ed introne 1.

Lo strumento di analisi Alternative Splice Site Predictor, basato sul database ALTEXTRON, è stato poi utilizzato per predire e classificare i siti di giunzione non canonici, ed è emerso come il sito accettore di giunzione alternativa più probabile a monte dei GAA sia la sequenza nella posizione del 683 nucleotide dell'introne 1. Inoltre, dagli esperimenti di sequenziamento sono state identificate anche delle rare isoforme con estremità 3' modificate a valle dell'esone 4 (si veda **Figura 4C** dell'articolo riportato in appendice).

#### **4.6 Il livello di *FXN-ett* è correlato alla lunghezza del più lungo dei due alleli GAA**

Svolgendo la tecnica qRT-PCR gli autori hanno misurato l'espressione del trascritto *FXN-ett* in 14 linee di fibroblasti FRDA e 12 linee di fibroblasti di controllo, dimostrando come le cellule FRDA esprimano meno mRNA di *FXN* e più trascritto *FXN-ett*.

Adottando la convenzione che definisce GAA1 il più corto dei due alleli espansi e GAA2 il più lungo, studi precedenti a quello discusso in questa tesi hanno rivelato mediante analisi statistiche una forte correlazione inversamente proporzionale tra la lunghezza delle ripetizioni presenti in GAA1 e l'età di esordio della malattia, e come i sintomi clinici e le caratteristiche cliniche dell'ataxia di Friedreich siano associati in modo più significativo all'allele più breve GAA1, le cui dimensioni sono risultate maggiori nei pazienti confinati su una sedia a rotelle (Filla, A et al., 1996).

Nello studio condotto dagli autori, l'espressione dell'mRNA di *FXN* nei fibroblasti FRDA è effettivamente correlata con GAA1; invece, il livello di *FXN-ett* risulta correlato al numero di ripetizioni in GAA2, non in GAA1.

Questa correlazione è insolita, e indica che i tratti GAA di lunghezza maggiore probabilmente promuovono la terminazione prematura della trascrizione di *FXN* e la produzione di *FXN-ett*.

#### **4.7 *FXN-ett* è stabile ed espresso in diverse cellule e nei topi transgenici modello di FRDA**

Gli autori hanno in seguito determinato l'espressione di *FXN-ett* in altri tipi cellulari, per comprenderne la rilevanza in FRDA.

Le analisi della PCR quantitativa hanno rivelato un'alta sovraregolazione del trascritto *FXN-ett* nel tessuto autoptico cardiaco ottenuto da pazienti con FRDA, rispetto a controlli non affetti; ma viene anche facilmente rilevato in neuroni e cardiomiociti derivati dalle iPSC FRDA.

Inoltre, gli autori hanno rilevato la presenza di *FXN-ett* anche nei topi transgenici modello di FRDA, nello specifico nei topi YG8s, che esprimono fratassina umana da una singola copia del transgene YAC, che ospita circa 800 ripetizioni GAA nell'introne 1; mentre, nei topi wild-type non è stata individuata l'espressione del trascritto *FXN-ett*.

In particolare, l'espressione di *FXN-ett* nei topi transgenici è stata osservata nel cuore, nel midollo spinale, nel cervello e nel cervelletto.

Infine, è stato stabilito che l'RNA *FXN-ett* è stabile, con un'emivita di circa 6 ore, sia nei topi che nei fibroblasti primari FRDA.

#### **4.8 L'escissione dei GAA espansi mediante CRISPR-Cas9 ripristina l'espressione di *FXN* e diminuisce quella di *FXN-ett***

Per confermare che la terminazione prematura della trascrizione (PTT) e che la formazione dell'RNA *FXN-ett* siano determinate dai GAA espansi, gli autori hanno escisso entrambe le ripetizioni GAA dall'introne 1 del gene *FXN* mediante il sistema CRISPR/Cas9.

I siti di taglio sono stati creati 392 bp a monte e 976 bp a valle delle ripetizioni GAA, e l'editing è stato confermato mediante PCR e il sequenziamento del DNA. Sono state modificate due linee FRDA iPSC (FRDA 2 e 3) ottenendo due cloni  $\Delta$ GAA indipendenti e ciò che è emerso rimuovendo le ripetizioni da entrambi gli alleli è un forte aumento sia dell'espressione dell'mRNA *FXN* che della fratassina, eliminando quasi completamente la formazione di *FXN-ett*.

Inoltre, i risultati ottenuti dall'esperimento di 3'RACE condotto mediante l'utilizzo di linee parentali e GAA modificate hanno rivelato l'assenza di *FXN-ett*, confermando nuovamente il ruolo dei GAA espansi nel blocco trascrizionale di *FXN*.

#### **4.9 Il targeting con ASO dei GAA espansi diminuisce l'espressione di *FXN-ett* e aumenta quelli di *FXN***

Gli autori hanno ipotizzato che il targeting diretto dei GAA espansi possa portare ad una maggiore velocità di passaggio di Pol II attraverso le ripetizioni GAA, con conseguente aumento della produzione dell'mRNA di *FXN* e diminuzione del trascritto *FXN-ett*.

Infatti, la trasfezione di fibroblasti primari FRDA con Gap17 gapmer ASO ha aumentato l'espressione dell'mRNA di *FXN* e ha ridotto significativamente di livelli di *FXN-ett*, suggerendo che le conformazioni del DNA e/o DNA/RNA adottate dalle ripetizioni GAA impediscono la progressione della trascrizione di *FXN*.

## 5. DISCUSSIONE

Nell'articolo trattato in questa tesi ritengo che gli autori abbiano dimostrato in modo convincente come la progressione della trascrizione del locus *FXN* sia effettivamente inibita dalla presenza delle ripetizioni GAA espanse, con conseguente formazione del trascritto aberrante *FXN-ett*, che termina immediatamente a monte delle stesse.

In particolare, è stato osservato come la formazione di questo trascritto sia correlato alla lunghezza di GAA2, nonostante le caratteristiche della malattia definite finora risultano correlate a GAA1 e non a GAA2, rendendo questo risultato insolito. Tuttavia, è probabile che i tratti GAA più lunghi influiscano in maniera più significativa la formazione del trascritto *FXN-ett* rispetto ai tratti GAA1, a loro volta responsabili della formazione dell'mRNA *FXN* canonico residuo nelle cellule FRDA.

I risultati ottenuti risultano ancor più interessanti se considerati insieme a quelli tratti mediante altre analisi e altri obiettivi di ricerca in merito all'ataxia di Friedreich:

Sono stati effettuati degli studi in vitro su lunghe ripetizioni GAA-TTC che dimostrano come questi possano adottare strutture stabili a tripla elica di DNA, e a triplo filamento di DNA-RNA, detti R-loop, in grado di terminare prematuramente la trascrizione. Inoltre, sono numerosi i rapporti che collegano l'instabilità delle ripetizioni nucleotidiche ricche di guanina con la formazione di queste strutture.

Gli R-loop sono strutture non canoniche che si creano durante la trascrizione: il modello più accettato per la loro formazione è il modello "thread-back", in cui il trascritto nascente invade la doppia elica di DNA non appena esce dalla RNA polimerasi. Numerosi rapporti suggeriscono come una frequenza maggiore di quella attesa di queste strutture possano minacciare l'espressione genica e l'integrità del genoma e infatti, sia cellule procariotiche che eucariotiche impiegano fattori e meccanismi diversi per contrastare la formazione di queste strutture ibride (Aguilera A. et al., 2012).

È stato inoltre dimostrato in diversi sistemi modello come la presenza delle espansioni GAA cambi l'ambiente locale della cromatina tipico dell'eterocromatina.

L'eterocromatina è definita epigeneticamente dalla metilazione dell'istone H3 nella lisina 9 (H3K9me3) e dal reclutamento della proteina legante l'eterocromatina: HP1. Una visione prevalente del silenziamento eterocromatico è che l'associazione tra questi porti alla compattazione della cromatina, escludendo, dal punto di vista sterico, il legame di altre proteine come la RNA polimerasi, al DNA (Strom, Amy R. et al., 2017). Anche nel caso specifico dell'ataxia di Friedreich si osserva una sovra-rappresentazione dell'istone H3K9me3 nell'introne 1 di *FXN*, ed un accumulo delle proteine leganti la cromatina, in particolare HP1 $\alpha$  e HP1 $\gamma$  a monte delle ripetizioni GAA nelle cellule FRDA rispetto ai controlli. L'accumulo di HP1 $\alpha$ , la sua organizzazione e interazione con l'istone H3K9me3 potrebbero portare alla formazione di condensati potenzialmente in grado di respingere il macchinario di trascrizione a livello delle espansioni GAA; tuttavia, è probabile che almeno parte di questi condensati vengano risolti durante la replicazione del DNA, consentendo

alla RNA polimerasi II di attraversare in maniera più efficiente i tratti GAA ripetuti durante la sintesi di DNA. Questo porta a pensare che gli studi condotti sulle cellule in divisione o neuroni e cardiomiociti immaturi derivanti da iPSC in realtà sottostimino la presenza di *FXN-ett*, rispetto a studi condotti su cellule terminalmente differenziate che non si dividono.

Una possibilità è che *FXN-ett* formi interazioni stabili di tipo ibrido DNA-RNA con la cromatina del gene *FXN*, impedendo la progressione dei macchinari di trascrizione a monte. Per approfondire questa ipotesi è stato inibito l'allungamento della trascrizione mediante l'utilizzo di actinomomicina-D, un peptide antibiotico in grado di intercalarsi nella doppia elica di DNA deformandola, e quindi impedendo il movimento della RNA polimerasi lungo lo stampo; entro 4 ore dal trattamento, i livelli di *FXN-ett* erano stati ridotti di circa il 50%, ma prolungando il trattamento fino a 8 ore non è stata rilevata un'ulteriore diminuzione di *FXN-ett*, suggerendo come una frazione del trascritto possa essere resistente alla degradazione, forse a causa dell'interazione stabile con la cromatina del locus *FXN*.

Inoltre, uno studio precedente dei medesimi autori dell'articolo discusso in questa tesi ha rivelato come la velocità di allungamento della trascrizione sia diminuita nell'introne 1 del gene *FXN*. Una trascrizione più lenta favorisce la formazione di processi di splicing alternativo e poliadenilazione; e questo, relazionata alla presenza di ripetizioni GAA espanse favorirebbe la formazione del trascritto *FXN-ett* con splicing aberrante, nonché la poliadenilazione alternativa ad esso associata. Infatti, la maggiore velocità di trascrizione rilevata nelle cellule di controllo, non influenzate dai GAA espansi, limita la formazione di splicing alternativi e poliadenilazione con conseguente formazione dell'mRNA di *FXN* canonico a lunghezza intera.

Infatti, il targeting con ASO della regione GAA espansa nelle cellule FRDA favorisce una progressione più efficiente del processo di trascrizione alleviando il blocco della trascrizione mediante l'interferenza con conformazioni non canoniche di DNA e DNA-RNA. Inoltre, l'escissione completa delle ripetizioni GAA mediante CRISPR/Cas9 riduce drasticamente i livelli di *FXN-ett*.

Studi precedenti hanno stabilito una correlazione tra la metilazione del DNA entro il corpo del gene e la regolazione dello splicing: la metilazione del DNA sembra essere dovuta dalla modificazione degli istoni, per esempio la loro metilazione o deacetilazione. Questa interviene sulla trascrizione impedendo il legame di un certo fattore al DNA o mediante il legame di proteine come MeCP2 (methyl-CpG binding protein 2) in grado di legarsi a siti metilati singoli e interagire con le istone deacetilasi (HDAC), portando come conseguenza ad una alterazione della cinetica di Pol II, promuovendo così lo splicing alternativo dell'RNA *FXN-ett* (Maunakea, Alike K et al., 2013).

Sono dunque numerosi i processi che compongono i difetti trascrizionali in FRDA e, nonostante non ci siano prove di un ruolo patogeno diretto del trascritto aberrante *FXN-ett*, potrebbe risultare molto utile approfondire studi di sintesi ancor più efficienti degli ASO. Inoltre, potrebbe essere efficace effettuare analisi mediante il targeting con ASO concentrandosi sulle diverse tipologie di splicing non produttivi rilevati in FRDA. Infatti, il blocco dello splicing non produttivo di

*FXN-ett* può portare ad un naturale aumento della trascrizione di *FXN* e conseguente aumento della proteina fratassina.

Trovo inoltre, che potrebbe risultare vantaggioso effettuare gli esperimenti per lo studio dell'espressione dei trascritti in cellule terminalmente differenziate, in modo da evitare il problema della sottostima dell'espressione del trascritto aberrante *FXN-ett* ed ottenere quindi dati ancor più affidabili; tuttavia, ritengo utile la scelta dell'utilizzo di cellule iPS da parte degli autori, in quanto cellule più facilmente manipolabili in laboratorio rispetto a cellule ottenute direttamente da materiale biotico.

Noto inoltre, che le linee cellulari FRDA1 e CTRL1 sono state riprogrammate a iPSC con un metodo differente rispetto alle linee FRDA2 e FRDA3, probabilmente per consentire un confronto tra i risultati ottenuti, verificandone anche l'attendibilità.


Stando alla misurazione dell'espressione dei trascritti invece, penso che sarebbe stato efficiente svolgere le qRT-PCR utilizzando per esempio le sonde TaqMan, invece del SYBER Green. Questa sostanza fluorescente infatti, non è specifica per un dato amplicone e rileva quindi anche eventuali prodotti a-specifici.

Con l'utilizzo delle sonde TaqMan si eviterebbe il problema di misurare la fluorescenza di prodotti a-specifici, poiché solo un aumento del prodotto a cui si appaia la sonda determina un aumento della fluorescenza.

## 6. BIBLIOGRAFIA

- 1) Cook, A, and P Giunti. "Friedreich's ataxia: clinical features, pathogenesis and management." *British medical bulletin* vol. 124,1 (2017): 19-30. doi:10.1093/bmb/ldx034
- 2) Bencze, Krisztina Z et al. "The structure and function of frataxin." *Critical reviews in biochemistry and molecular biology* vol. 41,5 (2006): 269-91. doi:10.1080/10409230600846058
- 3) Schmucker, Stéphane et al. "The in vivo mitochondrial two-step maturation of human frataxin." *Human molecular genetics* vol. 17,22 (2008): 3521-31. doi:10.1093/hmg/ddn244
- 4) Rodden, Layne N et al. "Methylated and unmethylated epialleles support variegated epigenetic silencing in Friedreich ataxia." *Human molecular genetics* vol. 29,23 (2021): 3818-3829. doi:10.1093/hmg/ddaa267
- 5) Mikaeili, Hajar et al. "FAST-1 antisense RNA epigenetically alters FXN expression." *Scientific reports* vol. 8,1 17217. 21 Nov. 2018, doi:10.1038/s41598-018-35639-2
- 6) Aguilera, Andrés, and Tatiana García-Muse. "R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability." *Molecular cell* vol. 46,2 (2012): 115-24. doi:10.1016/j.molcel.2012.04.009
- 7) Strom, Amy R et al. "Phase separation drives heterochromatin domain formation." *Nature* vol. 547,7662 (2017): 241-245. doi:10.1038/nature22989
- 8) Maunakea, Alike K et al. "Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition." *Cell research* vol. 23,11 (2013): 1256-69. doi:10.1038/cr.2013.110
- 9) Komarnitsky, P et al. "Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription." *Genes & development* vol. 14,19 (2000): 2452-60. doi:10.1101/gad.824700
- 10) Filla, A et al. "The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia." *American journal of human genetics* vol. 59,3 (1996): 554-60.

# Premature transcription termination at the expanded GAA repeats and aberrant alternative polyadenylation contributes to the *Frataxin* transcriptional deficit in Friedreich's ataxia

Yanjie Li<sup>1</sup>, Jixue Li<sup>1</sup>, Jun Wang<sup>1</sup>, Siyuan Zhang<sup>1</sup>, Keith Giles<sup>1</sup>, Thazha P. Prakash<sup>2</sup>, Frank Rigo<sup>2</sup>, Jill S. Napierala<sup>1,3</sup> and Marek Napierala <sup>1,3,\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Biochemistry and Molecular Genetics, University of Alabama at Birmingham, 1825 University Blvd., Birmingham, AL 35294, USA

<sup>2</sup>Ionis Pharmaceuticals Inc., 2855 Gazelle Court, Carlsbad, CA 92010, USA

<sup>3</sup>Department of Neurology, University of Texas Southwestern Medical Center, 5323 Harry Hines Blvd., Dallas, TX 75390, USA

\*To whom correspondence should be addressed. Tel: +1 2146483551; Fax: +1 2146456239; Email: Marek.Napierala@UTSouthwestern.edu

## Abstract

Frataxin deficiency in Friedreich's ataxia results from transcriptional downregulation of the *FXN* gene caused by expansion of the intronic trinucleotide guanine-adenine-adenine (GAA) repeats. We used multiple transcriptomic approaches to determine the molecular mechanism of transcription inhibition caused by long GAAs. We uncovered that transcription of *FXN* in patient cells is prematurely terminated upstream of the expanded repeats leading to the formation of a novel, truncated and stable RNA. This *FXN* early terminated transcript (*FXN-ett*) undergoes alternative, non-productive splicing and does not contribute to the synthesis of functional frataxin. The level the *FXN-ett* RNA directly correlates with the length of the longer of the two expanded GAA tracts. Targeting GAAs with antisense oligonucleotides or excision of the repeats eliminates the transcription impediment, diminishes expression of the aberrant *FXN-ett*, while increasing levels of *FXN* mRNA and frataxin. Non-productive transcription may represent a common phenomenon and attractive therapeutic target in diseases caused by repeat-mediated transcription aberrations.

## Introduction

Friedreich's ataxia (FRDA) is an autosomal recessive disease primarily caused by biallelic expansion of the guanine-adenine-adenine (GAA) trinucleotides located in intron 1 of the *FXN* gene (1,2). Although only a few GAA repeats are typically present in *FXN* loci of unaffected individuals, in FRDA patients this polypurine-polypyrimidine tract expands to hundreds of GAAs and can reach as many as ~1700 copies (1,3).

Since the discovery of the gene in 1996, the cause of the disease was determined, i.e. downregulation of *FXN* expression, making FRDA an example of a loss of function disease (1). In ~96% of patients, frataxin—the protein encoded by the *FXN* gene, does not carry any mutations; instead, the severe decrease of its levels leads to this progressive multisystem disorder (4,5). As determined in various tissues, frataxin levels in FRDA patients may decrease to a few percent relative to the amount detected in unaffected individuals (6–8). There is a strong correlation between mature *FXN* mRNA expression and the length of the expanded GAA repeats, especially the

shorter of the two alleles (termed GAA1) (9,10), however, the direct mechanism of the transcriptional impediment is unknown. It is not clear whether transcription machinery is properly assembled on the promoter, how transcription progresses from initiation to elongation at *FXN* and what is the actual role of long GAAs in transcriptional downregulation of *FXN* in FRDA (11). Our prior studies, based on comprehensive RNA-seq, demonstrated an impediment of transcription elongation in intron 1 of *FXN* in FRDA cells (10). Contrary to numerous other repeat expansion disorders, an effect of the repeat expansions on intron retention has not been detected in FRDA samples (12), suggesting that traversing the expanded GAAs rather than later transcript maturation steps is impaired in FRDA.

Prior chromatin immunoprecipitation (ChIP) studies demonstrated a change of the chromatin environment at the *FXN* gene linked to expansion of the GAA repeats (13–15). Histone modifications associated with active transcription in unaffected control samples are replaced with those characteristic for transcriptionally silenced

Received: April 14, 2022. Revised: May 12, 2022. Accepted: June 5, 2022

© The Author(s) 2022. Published by Oxford University Press. All rights reserved. For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>), which permits non-commercial re-use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited. For commercial re-use, please contact journals.permissions@oup.com

DNA in FRDA cells. These changes are localized to the regions upstream and downstream of the repeats and do not spread toward the *FXN* promoter/transcription start site (TSS) region (10,14–16). Furthermore, increased CpG methylation has been detected in a small differentially methylated region (DMR) in intron 1 of *FXN* upstream of the expanded GAAs (17). Again, the promoter and associated CpG island are not differentially methylated between control and FRDA samples. Combined, results of prior studies suggest that transcription is initiated less efficiently in FRDA cells and events downstream of the TSS are responsible for transcriptional deficiency in cells harboring expanded GAAs (10,16,18,19). Considering that the earlier described chromatin/DNA changes occur within the relatively short distance separating the TSS from GAAs (~1.5 kb), the logical question is: what is the fate of a transcript produced by RNA polymerase II (Pol II) molecules traversing an unfavorable chromatin environment, possible non-canonical DNA and DNA–RNA structures or simply homogeneous long tracts of GAA triplets that could span over 4000 bp? Answering this question is essential not only for a better understanding of the molecular events leading to *FXN* deficiency and FRDA but, more importantly, for the judicious design of potential therapeutic strategies based on reactivation of endogenous *FXN* transcription.

Herein, by applying various unbiased transcriptome analyses, in combination with genome editing and antisense oligonucleotide (ASO) treatment, we demonstrated that Pol II is recruited to the *FXN* promoter in FRDA cells, however, transition to productive elongation is hampered in these cells harboring expanded GAAs. Furthermore, combined RNA-seq, precision nuclear run-on sequencing (PRO-seq) and massive analysis of cDNA ends sequencing (MACE-seq) analyses showed the presence of a transcription termination zone in intron 1, upstream of the expanded GAAs indicating premature termination of RNA synthesis. We revealed that this premature termination results in forming a short, stable and aberrantly spliced transcript termed *FXN* early terminated transcript (*FXN-ett*). Targeting long GAA repeats with GAA-specific ASOs or excision of the expanded GAA repeats significantly increased *FXN* mRNA transcription and abrogated the formation of the aberrant, short transcript. Results of this work represent the first evidence that expanded repeats, likely via non-canonical stable DNA/DNA–RNA conformations or formation of a phase-separated domain, redirect the transcription program and stimulate the formation of an alternatively spliced and polyadenylated transcript, thus resulting in further decrease of the mature functional *FXN* mRNA and frataxin.

## Results

### Recruitment of RNA polymerase II to the *FXN* promoter is unaffected in FRDA cells

Our prior studies demonstrated that the promoter region required for efficient transcription of the human *FXN*

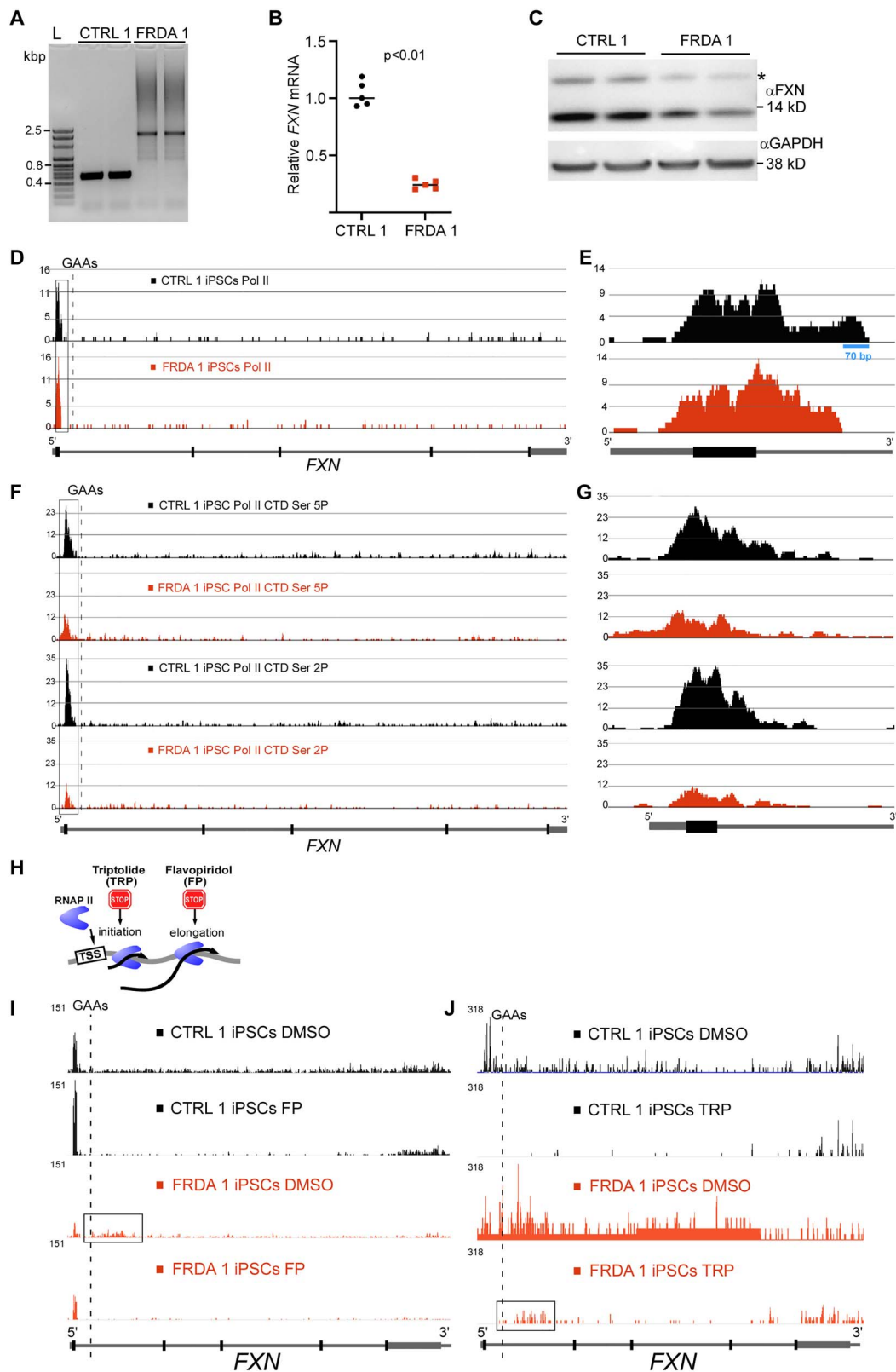
gene extends from approximately 80 bp upstream of the TSS, through exon 1 into approximately 115 bp of intron 1 (20). The GAA tract is located 1340 bp from the exon 1–intron 1 junction, thus in proximity to the TSS. Considering that full maturation of the transcription machinery is achieved several thousand base pairs downstream of the TSS (21), expanded GAAs are encountered by an immature transcription complex. In addition, our prior analyses of RNA-seq data demonstrated that the transcription elongation rate at intron 1 of *FXN* is decreased in the presence of the expanded GAA repeats (10).

To determine the transcriptional status of the *FXN* locus, we first performed ChIP experiments using an antibody specific for total Pol II, followed by next-generation sequencing. We utilized induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from control and FRDA fibroblasts (FRDA 1 and CTRL 1, [Supplementary Material, Table S2](#)), with confirmed GAA expansions of ~600 repeats on both alleles and decreased *FXN* mRNA/protein levels compared with CTRL 1 cells ([Fig. 1A–C](#)). Frataxin is a ubiquitously expressed gene with iPSCs expressing a relatively high level of the *FXN* mRNA, albeit still significantly decreased by expanded GAAs ([Fig. 1B](#)). Therefore, they represent a good model to determine the transcription dynamics at the *FXN* locus in both control and FRDA cells. ChIP-seq analysis revealed similar occupancy of the *FXN* gene promoter region by Pol II in CTRL and FRDA cells, indicating that recruitment of the transcription machinery to the *FXN* promoter region is not affected in FRDA ([Fig. 1D](#)). Discrete bimodal distribution of Pol II reads (22) at the TSS and proximal pausing site was observed in both FRDA 1 and CTRL 1 samples ([Fig. 1E](#)). Our prior studies demonstrated that the *FXN* promoter sequence includes exon 1 and an adjacent fragment of intron 1 (20). This fragment, critical for transcription, was occupied by Pol II in FRDA and CTRL cells. However, in controls an additional region spanning ~70 bp and extending further into intron 1 of *FXN* was observed ([Fig. 1E](#), blue bar). This region may represent Pol II transitioning into the active elongation phase in cells lacking expanded GAA repeats and indicates extended Pol II pausing in FRDA cells. As expected, Pol II ChIP-seq signal across the entire gene is low, not allowing for a detailed analysis of transcription progression at *FXN*.

### Expanded GAA repeats affect the transition from initiation to productive elongation

Total Pol II occupancy does not reflect the actual engagement of the transcriptional apparatus in mRNA synthesis. Determination of the presence of Pol II phosphorylated at the serine 5 (S5P) and serine 2 (S2P) positions of the C-terminal domain (CTD) is an indicator of active transcription initiation/elongation (23,24). ChIP-seq analyses of the same FRDA 1 and CTRL 1 iPSCs demonstrated significant decreases of both Pol II S5P and S2P signals at the *FXN* promoter region in patient cells ([Fig. 1F and G](#)). This indicates that expanded GAA repeats located ~1 kb from the distal end of the *FXN*





**Figure 1.** GAA repeats affect transition from the transcription initiation to productive elongation. (A) Size of the GAA repeats determined by PCR. Analysis of two control (CTRL 1) and two Friedreich's ataxia (FRDA 1) clones of the same iPSC line are shown. Both mutated *FXN* alleles harbor ~600 GAAs. (B) Expression of *FXN* mRNA measured in FRDA 1 and CTRL 1 cells by qRT-PCR. Data from two independent qRT-PCR experiments are shown. Statistical significance was determined using the Student's *t*-test. (C) Western blot analysis of frataxin protein expression in FRDA 1 and unaffected CTRL 1 iPSCs. Analysis of two independent clones is presented. GAPDH represents a loading control. Mature *FXN* migrates below the 14 kDa marker; asterisk denotes the intermediate form of frataxin, prior to the final maturation cleavage. (D) Total RNA Pol II ChIP-seq tracks at the *FXN* gene (schematic of the gene shown below tracks). Read density was normalized by MACS2. Data for control iPSCs are shown in black and for FRDA in red. Promoter region is boxed, dashed line indicates location of the GAA tract. (E) Magnification of the ChIP-seq tracks at the *FXN* promoter region for total Pol II reactions. (F) ChIP-seq tracks for Pol II phosphorylated at serine 5 (Ser 5P) and 2 (Ser 2P) of the CTD. Data for control iPSCs are shown in black and for FRDA in red. Independent

promoter affect the transition from the bound, inactive state complex to a transcriptionally active complex. To further evaluate the progression of transcription through the *FXN* locus in detail, we conducted precision run-on sequencing (PRO-seq) analyses in the presence of transcription initiation [triptolide (TRP)] and elongation [flavopiridol (FP)] inhibitors (Fig. 1H) (25). In agreement with ChIP-seq data, PRO-seq results revealed a lower abundance of active transcription in the promoter region of vehicle-treated FRDA cells compared with controls (Fig. 1I and J; DMSO lanes). Interestingly, in two entirely independent experiments, a noticeable increase of the PRO-seq signal was detected in intron 1 of *FXN* in patient iPSCs when compared with controls (Fig. 1I and J). Treatment with FP demonstrated that both FRDA and CTRL cells can actively initiate *FXN* transcription (increased signal at the promoter after FP treatment), although PRO-seq signal in CTRL iPSCs was significantly greater than FRDA cells. As expected, treatment with TRP resulted in an accumulation of PRO-seq reads at a transcription termination region (3'UTR) of *FXN* in both CTRL and FRDA iPSCs. However, similar to results obtained with vehicle treated cells, a lasting signal was detected within intron 1 of *FXN*, exclusively in FRDA iPSCs (Fig. 1J, boxed region). This is rather unexpected, as 50 min treatment with TRP typically allows transcribing Pol II to progress through the entire gene body to the transcription termination region as illustrated in CTRL cells. These results suggest a significant inhibition of the progression of the Pol II machinery at intron 1 containing the expanded GAAs or premature termination of transcription at this region.

### RNA-seq profiling reveals RNA accumulation upstream of the expanded GAAs in different FRDA cell types

Accumulation of the actively transcribing Pol II at intron 1 should result in a detectable buildup of the RNA-seq reads at *FXN* in FRDA cells. Indeed, analysis of RNA-seq data obtained from FRDA 1 and CTRL 1 iPSCs (Fig. 2A and C) and primary fibroblasts (Fig. 2B and D) revealed accumulation of sequencing reads in intron 1, predominantly upstream of the expanded GAAs in FRDA cells. In addition, reexamination of previously published RNA-seq data obtained from FRDA and CTRL cardiomyocytes corroborates this finding (26). The intronic reads are also detected in control cells, although fewer than FRDA cells, especially relative to the overall decreased *FXN* transcription in patient cells (Fig. 2A and B).

### GAA expansion induces aberrant transcription termination

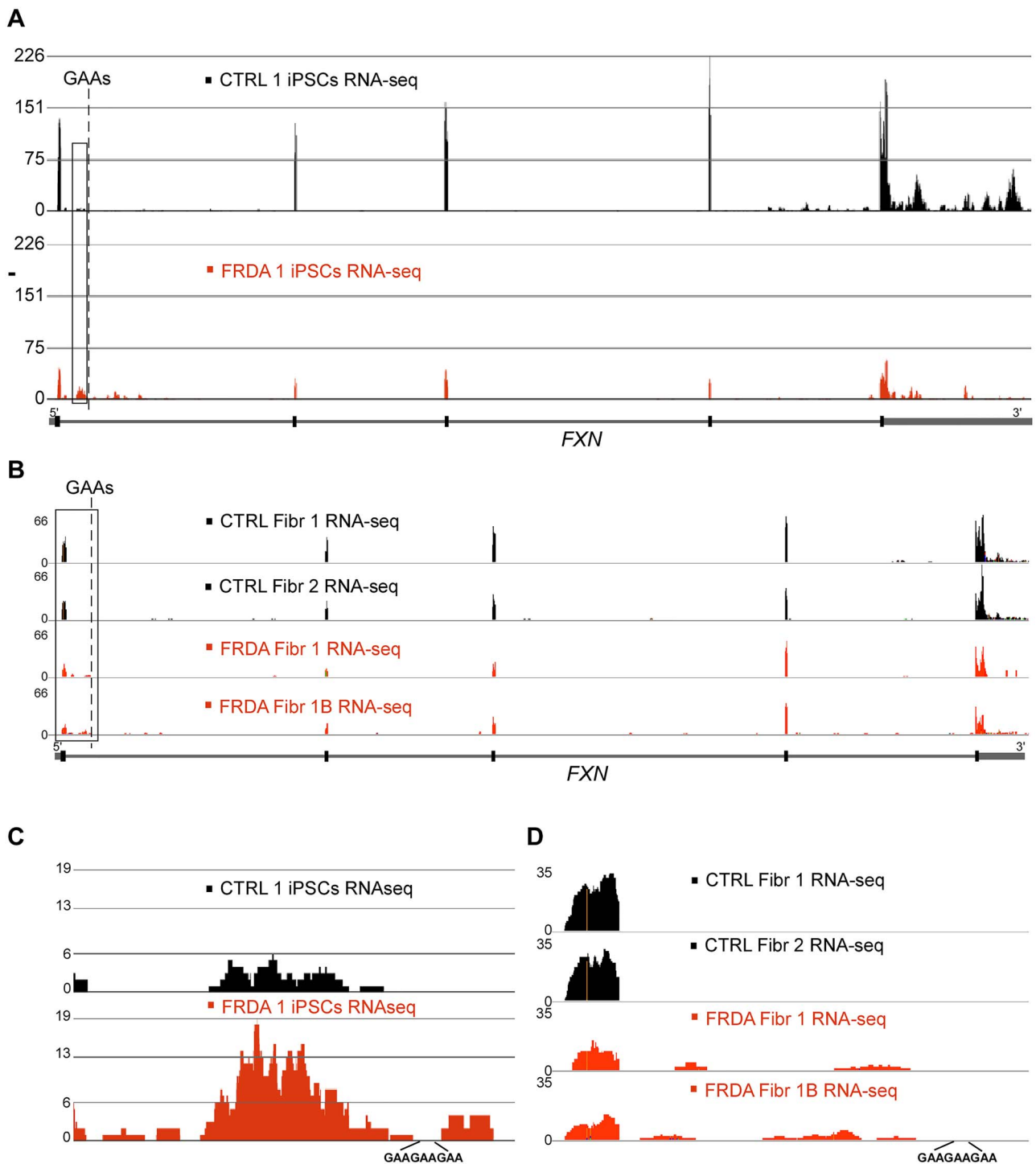
To further investigate the source of intronic RNA-seq and PRO-seq signals, we conducted a MACE-seq. Deep MACE-seq allows for precise differential gene expression analyses and enables the identification of novel transcripts and alternative polyadenylation (APA) signals in a strand-specific manner. MACE-seq of FRDA 1 and CTRL 1 iPSCs demonstrated, as expected, a strong PA signal at the 3'UTR (~350 nt downstream of the Stop codon) resulting from termination of canonical, full-length *FXN* mRNA (Fig. 3A). In addition, in FRDA cells, a signal upstream of the expanded GAA repeats was detected with an intensity comparable to the 3'UTR PA site signal (Fig. 3B). Bioinformatic analyses of the MACE-seq data indeed defined the peak upstream of the GAAs as an APA signal (Supplementary Material, Table S3). This data shows that a short, polyadenylated transcript that prematurely terminates upstream of the GAAs is preferentially accumulated in FRDA cells.

Reports of a polyadenylated antisense transcript overlapping with exon 1 and the 5'UTR of *FXN* exist (27,28), therefore we determined strand-specificity of the MACE-seq signal at *FXN*. No reads derived from the reverse strand (i.e. RNA transcribed in the opposite direction to *FXN*) were mapped (Fig. 3C), confirming that the short transcript terminated upstream of the GAAs is synthesized in the same direction as the full-length *FXN* mRNA.

### Prematurely terminated *FXN* transcript is alternatively spliced

Next, to confirm expression of the short, prematurely terminated transcript and determine its sequence, we utilized the 3' rapid amplification of cDNA ends (3' RACE) approach. We identified a single, predominant ~900 bp long 3' RACE product in CTRL cells. The length of this fragment is as expected for canonical *FXN* mRNA, considering the location of the *FXN* exon 1 primer and the known position of the major PA site in the *FXN* 3'UTR (Fig. 4A). Parallel analyses in FRDA iPSCs revealed a shorter ~700 bp PCR product in addition to the ~900 bp band (Fig. 4A). This 700 bp product is about half the length of the transcript predicted based on the APA identified upstream of the GAA repeats (Fig. 3; distance between the beginning of intron 1 and the first GAA is 1339 bp). The same 3' RACE patterns were observed in multiple FRDA cell lines, derived from different patients (Fig. 6E). Next, we determined the sequence of the transcript by cloning individual gel-extracted PCR products into a TA cloning vector and performing Sanger

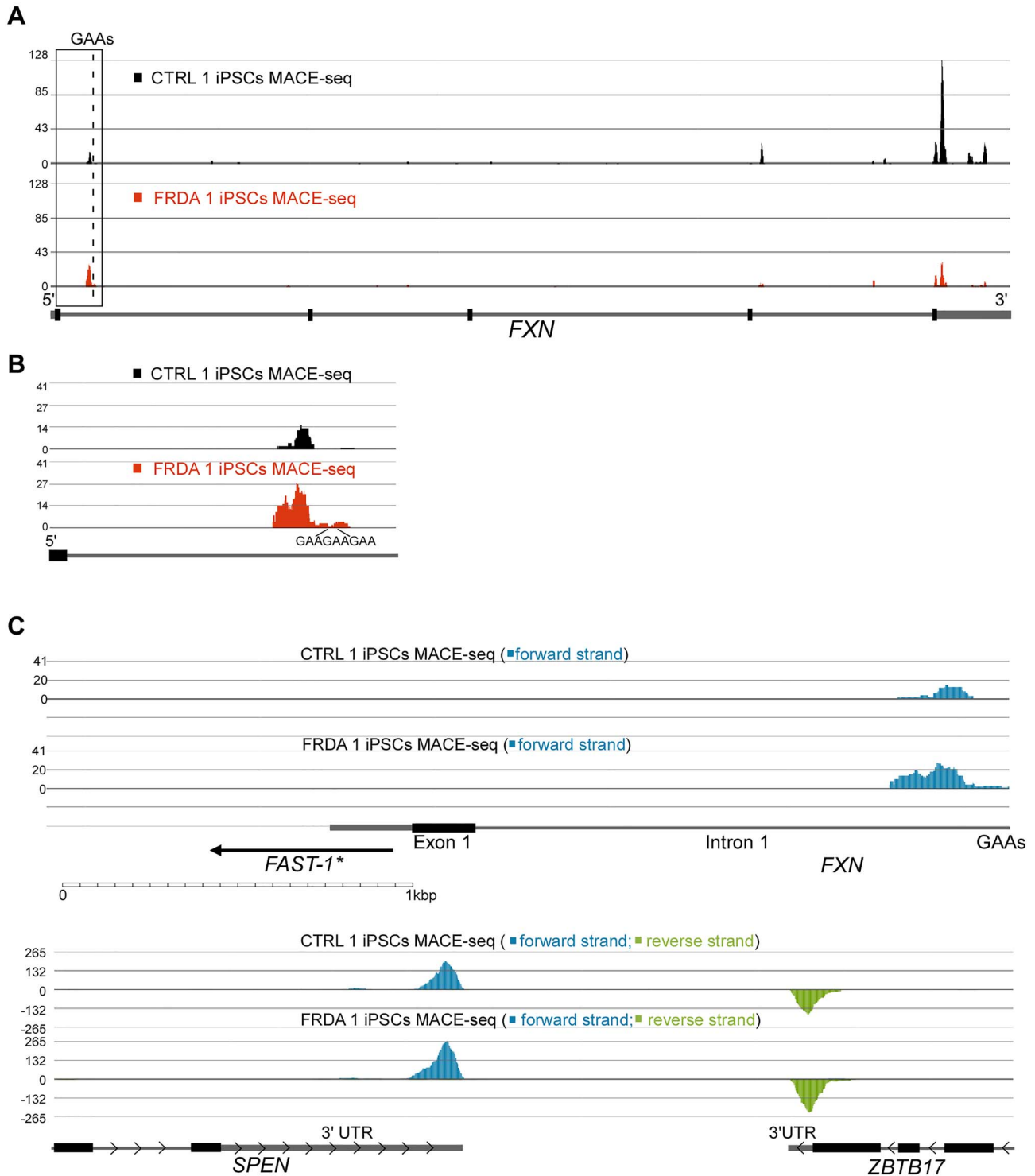
ChIP reactions for each sample-antibody pair were performed 3–5 times, DNA was combined before NGS library preparation and sequencing. Promoter region is boxed, dashed line indicates location of the GAA tract. (G) Magnification of the ChIP-seq tracks at the *FXN* promoter region for Pol II CTD Ser 5P and Ser 2P. (H) Illustration of TRP and FP effects on Pol II progression. (I) Effect of elongation inhibitor FP on *FXN* transcription determined by PRO-seq. DMSO reactions represent vehicle controls. Black tracks represent CTRL 1 and red tracks FRDA 1 iPSCs. Schematic of the *FXN* gene is shown in the following. PRO-seq signal was normalized between all samples as described in Methods section. The region of intron 1 enriched in PRO-seq reads in FRDA is indicated by a box. (J) Inhibition of transcription initiation by TRP results in accumulation of PRO-seq reads in the 3'UTR as well as in intron 1 (indicated by a box). DMSO reactions represent vehicle controls. Black tracks are CTRL 1 and red tracks are FRDA 1 iPSCs. Schematic of the *FXN* gene is shown in the following.



**Figure 2.** Accumulation of RNA upstream of the expanded GAAs in FRDA cells. **(A)** RNA-seq tracks of the FXN gene in CTRL iPSCs (black) and FRDA iPSCs (red). Dashed line indicates position of the GAA repeats. FXN gene schematic is shown in the following. **(B)** RNA-seq tracts displaying reads from the FXN gene in two CTRL (black) and two FRDA (red) primary fibroblast lines. **(C, D)** magnifications of the boxed regions of FXN upstream of the GAA repeats shown in (A) and (B), respectively. All sequencing was conducted using polyA capture, reads were mapped using STAR aligner and signals were normalized by DESeq2.

sequencing. Bands 1 and 2 (Fig. 4A and B) represent the longer fragment (common for FRDA and CTRL cells), whereas band 3 designates a shorter, FRDA-enriched product. Sequencing of 80 individual clones revealed that the longer transcript (bands 1 and 2) represents predominantly canonical full-length FXN mRNA containing exons 1 to 5 (Fig. 4C, isoform Type I and Supplementary Material, Fig. S1). Contrarily, most

transcripts (23 out of 25 clones sequenced) in FRDA cells represented by the shorter PCR product (band 3) encode RNA containing exon 1, a fragment of FXN intron 1 and terminate upstream of the expanded GAAs (Fig. 4C, isoform Type IV). Interestingly, the intronic part of this transcript lacks the first 683 nt, immediately downstream of the end of exon 1 (Fig. 4C and D and Supplementary Material, Fig. S2), thus explaining the



**Figure 3.** MACE-seq identifies a novel, FRDA-enriched polyadenylated transcript at the FXN locus. **(A)** Deep MACE-seq tracks obtained from CTRL (black) and FRDA (red) iPSCs. An excess of 80 M sequencing reads was generated per sample and mapped using STAR aligner. Peaks represent putative 3' ends of polyadenylated transcripts. Termination signal of the canonical, full length FXN mRNA is located in the 3'UTR. Bioinformatic analyses identified the presence of an alternative polyadenylated RNA terminated upstream of the expanded GAAs (see also [Supplementary Material, Table S3](#)). A schematic of the FXN gene is shown in the following. The dashed line indicates the location of the GAA repeats and the boxed region is magnified in **(B)**. **(C)** Verification of directionality of the transcripts generated within the FXN locus. All forward strand reads are shown in blue and reverse in green. No antisense transcript could be detected at the FXN locus in FRDA or CTRL iPSCs. Proposed location of FAST-1 antisense RNA (27) relative to the FXN mRNA 5'UTR, exon 1 and GAA repeats is shown. Scale of the image is indicated below and examples of reads mapped to the forward and reverse strand in two RNAs, SPEN and ZBTB17, transcribed in opposite directions.

discrepancy between the length of the expected (~1.4 kb) and experimental (~0.7 kb) PCR product obtained from the FXN transcript terminated upstream of the expanded GAA repeats. This result also indicated that the truncated FRDA-enriched transcript (*FXN-ett*) undergoes alternative splicing that removes a fragment of 683 nt proximal to exon 1 (Fig. 4D and [Supplementary Material, Fig. S2](#)). Additionally, examination of RNA-seq data from FRDA iPSCs revealed the presence of reads containing sequences resulting from the alternative splicing event ([Supplementary Material, Fig. S3](#)). The splicing machinery utilizes a canonical exon1/intron 1 splice donor site and recognizes the downstream alternative acceptor (SA) site. *In silico* alternative splicing prediction using Alternative Splice Site Predictor (29) identified the sequence at position 683 nt of intron 1 as the most likely alternative splice acceptor site in the region upstream of the GAAs ([Supplementary Material, Fig. S4](#)). Additionally, RNA structure analysis (mFold) (30) of the entire RNA fragment from the TSS to GAAs localizes this alternative SA in a single-stranded, accessible stem loop structure ([Supplementary Material, Fig. S5](#)). In addition to the predominant variants I and IV, rare FXN transcript isoforms, with modified 3'-ends downstream of exon 4 were identified in our sequencing experiments (Fig. 4C, isoforms Type II and III). All variants represented by a single clone were excluded from further analyses. In conclusion, we identified an FRDA-enriched transcript, *FXN-ett*, that is alternatively spliced and prematurely terminated in direct proximity to the expanded GAAs.

### **FXN-ett level correlates with the length of the longer of the two GAA alleles**

Based on the *FXN-ett* splicing information, we established a qRT-PCR assay to quantitatively measure its expression in FRDA and CTRL cells (Fig. 5A and B). A set of primary FRDA (14 lines) and control (12 lines) fibroblast lines from our FRDA Cell Line Repository was used to determine *FXN-ett* expression. As demonstrated before, FRDA fibroblasts express significantly ( $P < 0.0001$ ) less FXN mRNA than controls (as measured by exon 3-exon 4 qRT-PCR assay, Fig. 5A and C), however, they exhibit significantly higher levels of the *FXN-ett* RNA (Fig. 5D,  $P = 0.0048$ ). FRDA is an autosomal recessive disease with most known cases (~96%) attributed to the expansion of GAA repeats on both FXN alleles (1,4). A convention has been adopted terming the shorter of the two expanded alleles GAA1 and the longer GAA2 (9). To our knowledge, FRDA traits (clinical symptoms or molecular characteristics (e.g. disease onset, FXN mRNA and protein level, etc.) correlate significantly with the length of the shorter tracts (GAA1) (9,31). Likewise, the FXN mRNA expression level in the set of FRDA fibroblasts analyzed in this study correlates well with GAA1 (Fig. 5E). On the contrary, the level of *FXN-ett* correlates with the number of repeats in GAA2, not GAA1 (Fig. 5F and G). This is, to our knowledge, the first example of a trait in FRDA that shows a stronger correlation with the longer of the two

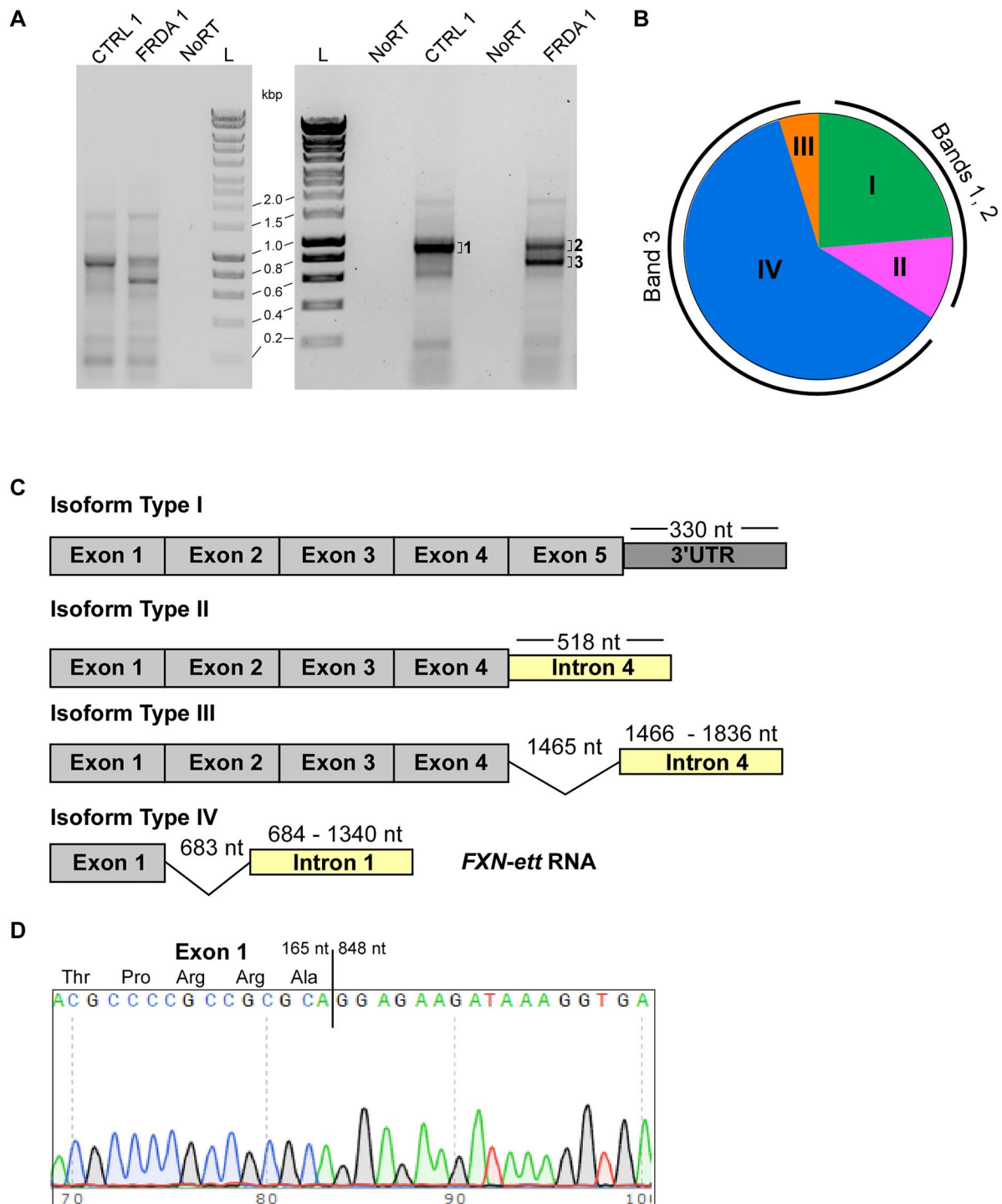
expanded alleles. Moreover, this indicates that GAA tracts of longer lengths are likely to promote early termination of FXN transcription upstream of the GAAs and facilitate the production of *FXN-ett*.

### **FXN-ett is stable, expressed in different cells and in FRDA humanized transgenic mice**

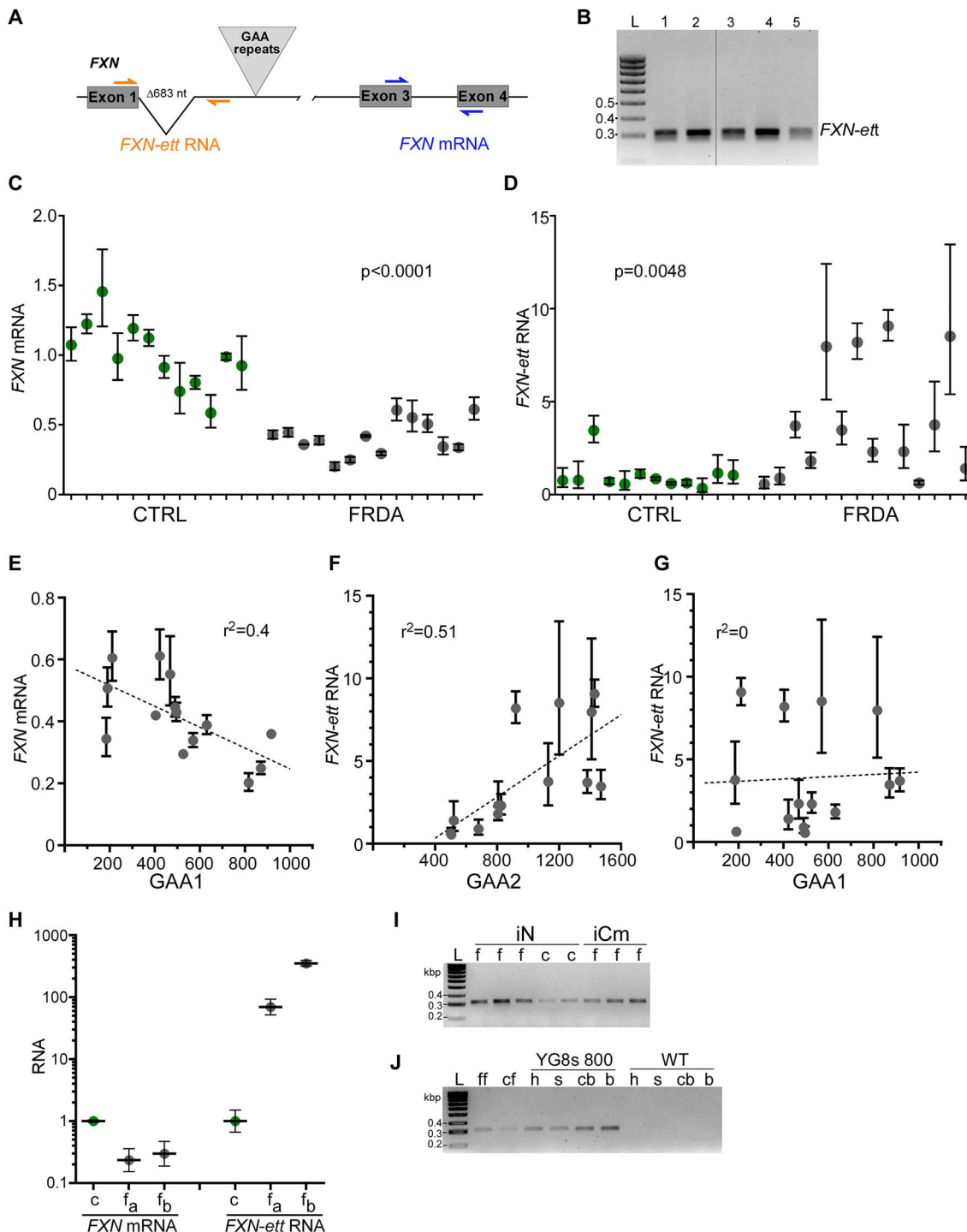
To establish the relevance of *FXN-ett* expression to FRDA, we sought to determine *FXN-ett* expression in other cell types, including patient-derived tissues. Quantitative RT-PCR analyses showed that *FXN-ett* is highly upregulated in cardiac autopsy tissue obtained from FRDA patients compared with an unaffected control (Fig. 5H). In addition, *FXN-ett* could be readily detected in iPSC-derived neurons and cardiomyocytes (Fig. 5I). Finally, we also tested whether *FXN-ett* is present in FRDA humanized transgenic mice. We detected this transcript in the heart, spinal cord, cerebrum and cerebellum from the YG8s 800 mice (FRDA mouse model expressing human frataxin from a single copy YAC transgene harboring ~800 GAAs in FXN intron 1) (32), but not in wild type mice (Fig. 5J). Lastly, we established that the *FXN-ett* RNA is stable with ~6 h half-life as determined in two different FRDA primary fibroblast lines ([Supplementary Material, Fig. S6](#)). Taken together, these results indicate wide expression of a stable *FXN-ett* RNA in patient tissues and cell lines and in a FRDA animal model harboring expanded GAAs.

### **CRISPR-Cas9 excision of the expanded GAAs restores FXN expression and decreases FXN-ett expression**

Data presented earlier indicate that a block imposed by the expanded GAAs drives premature transcription termination (PTT) and formation of the *FXN-ett* RNA. To confirm this, we excised both expanded GAA tracts from intron 1 of FXN using CRISPR/Cas9 editing. The gRNAs were designed downstream of the *FXN-ett* splice acceptor site to avoid interference with potential alternative splicing ([Supplementary Material, Fig. S7](#)). The cut sites are located 392 bp upstream and 976 bp downstream of the GAA repeats (Fig. 6A). Editing was confirmed by junction PCR, GAA repeat PCRs as well as DNA sequencing ([Supplementary Material, Fig. S7](#)). We edited two different FRDA iPSC lines (FRDA 2 and 3) and two independent  $\Delta$ GAA clones were obtained for each line (Fig. 6B and C; [Supplementary Material, Fig. S7](#)). Excision of the intronic GAAs from both alleles resulted in robust increase of FXN expression both at the mRNA and protein levels in all four edited clones (Fig. 6B and C). Removal of the GAA expansion almost completely abolished formation of the early terminated *FXN-ett* RNA in all edited clones (Fig. 6D). Furthermore, results of the 3' RACE experiment conducted using parental and GAA-edited lines revealed absence of the *FXN-ett* band, confirming that the expanded GAAs are responsible for the transcriptional impediment during early elongation and formation of the aberrantly spliced, prematurely terminated *FXN-ett* RNA.



**Figure 4.** FXN-ett is alternatively spliced and enriched in FRDA cells. **(A)** Results of 3' Rapid Amplification of cDNA Ends PCR performed using FRDA and CTRL iPSCs. Results of two independent experiments are shown. NoRT represents control reactions lacking reverse transcriptase. L—1 kb Plus DNA ladder (BioLine). Bands indicated by 1, 2 and 3 were excised from the agarose gel, cloned and sequenced. **(B)** Isoforms of the FXN transcripts identified by DNA sequencing of 80 clones. Three independent 3'RACE/cloning experiments were conducted. Only isoforms represented by two or more independent clones are shown. Isoforms I and II were identified by sequencing the longer PCR products (bands 1 and 2), isoforms III and IV were identified only in the shorter PCR product (band 3). Isoform I represents canonical FXN mRNA (Supplementary Material, Fig. S1). The pie chart illustrates proportions of different isoforms identified in the experiment but it is not a quantitative representation of relative abundance of different isoforms transcribed at the FXN locus. **(C)** Schematic illustrations of isoforms I-IV. Transcript regions (exons, introns, 3'UTR) are not shown to scale. Lengths of the 3'UTR, intron 4 and intron 1 are measured from the end of the preceding exon. Spliced fragments in isoforms III and IV are depicted by a thin line. Isoform IV—the predominant 3' RACE product identified in band 3 was termed FXN-ett. **(D)** DNA sequencing result of the FXN-ett transcript. A junction between the last nucleotide of exon 1 (165 nt relative to 'A' of the ATG initiation codon) and 848 nt of the transcript (relative +1 nt 'A' of the ATG) revealed splicing of a 683 nt fragment of intron 1. The full sequences of the FXN-ett transcript as well as the canonical Type I isoform are presented in Supplementary Material, Figs S1 and S2.



**Figure 5.** FXN-ett is expressed in different FRDA cells and correlates with GAA repeat length. **(A)** Location of the qRT-PCR primers used to detect FXN-ett (orange) and canonical FXN mRNA (blue). **(B)** Example of the FXN-ett RT-PCR product (lanes 1–5); L- represents 100 bp ladder (Bioline) **(C)** Expression of the FXN mRNA is reduced in FRDA fibroblasts (gray symbols) compared with CTRL lines (green symbols). All qRT-PCR reactions were performed using RNA extracted from 12 different CTRL and 14 different FRDA fibroblast lines. Statistical significance ( $P < 0.05$ ) was determined by Student's t-test. **(D)** FXN-ett is highly upregulated in FRDA fibroblasts. The same samples described in (C) were used for FXN-ett qRT-PCR analyses. **(E)** An inverse correlation between GAA1 repeat size (shorter of the two expanded GAA alleles) and FXN mRNA expression in 14 FRDA fibroblast lines analyzed in (C). The  $r^2$  value for the fit of each line is shown. **(F)** FXN-ett RNA expression directly correlates with the length of GAA2 (longer of the two expanded GAA alleles) in FRDA fibroblasts and does not correlate with GAA1 length **(G)**. The  $r^2$  value for the fit of each line is shown. **(H)** FXN mRNA and FXN-ett expression in CTRL and FRDA autopsy heart tissues. c—unaffected control (green symbol), fa and fb—samples obtained from two different FRDA patients (gray symbols). **(I)** FXN-ett is detected in cortical neurons (iN) differentiated from FRDA (f) and control (c) iPSCs as well as FRDA iPSC-derived cardiomyocytes (iCm). L—100 bp ladder. **(J)** FXN-ett is expressed in the humanized transgenic FRDA YG8s(GAA) > 800 mouse heart (h), spinal cord (s), cerebellum (cb) and cerebrum (b). Amplification of FXN-ett RNA in FRDA (ff) and control (cf) fibroblasts is shown as positive control and wild type mouse tissues served as negative controls.





## Targeting expanded GAAs with ASOs decreases FXN-ett expression and elevates FXN levels

It has been demonstrated that interfering with non-canonical DNA and/or DNA–RNA structures formed by expanded GAAs via repeat-targeting ASOs increases FXN expression (33–38). We hypothesized that direct targeting of the expanded GAAs will facilitate a greater rate of Pol II passage through the expanded GAAs, resulting in increased production of FXN mRNA and decreased levels of FXN-ett RNA. Indeed, transfection of FRDA primary fibroblasts with Gap17 gapmer ASO (39) increased FXN mRNA expression relative to the control ASO, MALAT-1 (Fig. 6F). In agreement with our predictions, releasing the block imposed by the expanded repeats resulted in a significant decrease of the FXN-ett RNA level, suggesting that DNA and/or DNA/RNA conformations adopted by expanded GAAs impede progression of FXN transcription (Fig. 6F).

## Discussion

A block in transcription progression caused by expanded GAA repeats has been recurrently postulated as the mechanism of FXN mRNA deficiency in FRDA. However, neither direct evidence for a repeat-induced transcription block nor the exact underlying cause of the impediment has been conclusively demonstrated in patient cells. These two outstanding issues separate us from a complete understanding of the molecular basis of FRDA pathogenesis and possibly, from successful therapies that would specifically reactivate FXN expression in patient cells.

Herein, we comprehensively addressed the first of these two challenges and, using a battery of unbiased approaches and different FRDA model systems and patient samples, we showed that transcription progression is indeed affected at the FXN locus resulting in the GAA-length dependent formation of an aberrant, early terminated and alternatively spliced transcript, FXN-ett. Interestingly, PTT in FRDA occurs immediately upstream of the expanded GAAs and correlates with the length of GAA2, the longer of the two expanded GAA alleles.

This fact is unusual as practically all disease characteristics (both molecular and clinical) defined thus far correlate with GAA1 length (5,10,40), but not unexpected. Long GAAs are likely to significantly contribute to aberrant transcription termination and formation of FXN-ett when compared with shorter GAA tracts that are, in turn, responsible for expression of residual, canonical FXN mRNA in FRDA cells.

*In vitro* studies on long polypurine-polypyrimidine tracts indicate that GAA-TTC repeats can adopt stable triple helical DNA structures (41–43). Furthermore, evidence exists that triple stranded DNA–RNA

confirmations (R-loop like) are formed in FRDA cells (35,44,45), however, recent controversies on the antibody-based methods used to detect R-loops indicate that formation of RNA–DNA hybrids at expanded GAAs may need to be verified by additional methods (46–48). Both stable triplexes and R-loops can impede Pol II movement and stimulate PTT (49–51). The expanded GAAs in FRDA frequently exceed 1000 triplets equaling more than 3000 bp of typically uninterrupted polypurine-polypyrimidine DNA. In addition, it has been shown in different model systems that GAA expansion causes changes in the local chromatin environment, predominantly increased representation of histone marks associated with heterochromatin, such as H3K9me3 (13,14). This is accompanied by accumulation of heterochromatin proteins HP1 alpha and gamma (HP1 $\alpha$  and HP1 $\gamma$ ) upstream of the GAA repeats in FRDA cells when compared with controls (27), revealing a possibility that binding of these proteins to the GAAs (or non-canonical DNA/DNA–RNA conformations adopted by these sequences) may facilitate transcriptional repression. Recent studies showed that human HP1 $\alpha$  can form phase-separated condensates (52–54). Accumulation of HP1 $\alpha$ , its self-organization and interaction with histone H3K9me3 (overrepresented in FXN intron 1) can lead to formation of heterochromatin phase-separated condensates at the expanded GAAs that efficiently repel transcription machinery (55). These condensates are likely to be dispersed, at least to a certain extent, during DNA replication, allowing for transcription machinery to traverse expanded GAAs more efficiently during DNA synthesis compared with non-dividing, terminally differentiated cells. Therefore, contribution of the FXN-ett may be underestimated in studies conducted predominantly in dividing cells or in immature iPSC-derived neurons or cardiomyocytes. Data from patient tissues presented here demonstrate that the transcription defect maybe more severe in terminally differentiated FRDA cells, resulting in enhanced PTT, formation of the FXN-ett, and ultimately profound FXN mRNA downregulation. Limited frataxin expression data available from terminally differentiated tissues are in line with these findings (6,7). This is also consistent with observations made in animal FRDA models showing progressive, age-dependent decreases of Fxn expression in disease-relevant tissues (56).

Transcription elongation rate is linked to upstream events occurring on nascent RNA, and frequently the speed of transcription determines the ‘window of opportunity’ for processes of alternative splicing or polyadenylation (57). This model can be directly applied to the FXN gene harboring expanded GAA repeats, as our prior work indicated that transcription elongation speed is decreased in intron 1 in FRDA cells (10).

Transcription deceleration creates an opportunity for the use of strong alternative splicing signals resulting in generation of aberrantly spliced *FXN-ett*. In addition, presence of the GAA-mediated impediment stimulates the use of alternative PA and premature termination of transcription. Greater speed of transcription through *FXN* in control cells, not affected by expanded GAAs, limits the opportunity for alternative splicing and polyadenylation, hence resulting in synthesis of the full length, canonical *FXN* mRNA (Fig. 7A and B). Targeting the expanded GAA region with ASOs or GAA-specific polyamides was demonstrated to interfere with non-canonical DNA/DNA–RNA conformations and increased expression of the *FXN* mRNA (35,58). More efficient progression of the transcription machinery through the GAA repeat region reduced opportunities for alternative splicing and formation of *FXN-ett* (Fig. 7C). Lastly, removal of the intronic GAA tracts (on both *FXN* alleles) using CRISPR/Cas9 excision resulted in restoration of *FXN* mRNA expression to the level observed in control cells and dramatically reduced *FXN-ett* levels, thus directly linking early transcription termination and formation of *FXN-ett* to the presence of a long GAA tract (Fig. 7D). Importantly, our editing strategy removed the expanded GAA region and flanking sequences, however the alternative SA site utilized to form *FXN-ett* was not affected (Supplementary Material, Fig. S7).

An additional possible contributor to the alternative splicing and early transcription termination at *FXN* in FRDA cells is DNA methylation, as the link between splicing and DNA methylation has been well established (59,60). Recently, a DMR was identified in intron 1 of *FXN*, upstream of the GAAs. This DMR, spanning 10 CpGs (~200 bp) immediately upstream of the SA of *FXN-ett*, is almost completely methylated in patients' DNA when compared with unaffected controls (17). Mechanistically, a significant increase of DNA methylation in the FRDA-DMR may lead to enrichment of methyl-CpG binding protein 2 occupancy, recruitment of histone deacetylases and consequently alter Pol II kinetics to promote alternative splicing of the *FXN-ett* RNA.

What could be the consequences of *FXN-ett* synthesis? The most obvious direct impact of PTT on frataxin levels is unproductive utilization of the transcriptional machinery resulting in generation of a non-functional transcript, therefore decreasing the expression of full length *FXN* mRNA. Considering the shorter half-life of *FXN-ett* relative to *FXN* mRNA, quantitative analyses of its expression suggest that most of the *FXN* transcriptional activity may be directed toward synthesis of this aberrant transcript. Overall, successful transcription of an entire gene is a rather rare event. It has been determined that only ~1% of initiation events result in mRNA production and an overwhelming majority of initiations results in PTT at the promoter (61,62). At *FXN*, this low success rate is further exacerbated by PTT caused by expanded GAAs, resulting in profound downregulation of the *FXN* mRNA. The process and its consequences are strongly associated

with the length of the pathogenic GAA region. Another possibility exists that *FXN-ett* forms stable DNA/RNA hybrid-like interactions with chromatin at the *FXN* gene, actively impeding progression of upstream transcription machineries. Closer examination of the *FXN-ett* half-life data suggests that blocking transcription by actinomycin D reduces levels of *FXN-ett* to ~50% of the starting amount within ~4 h, while further treatment (up to 8 h) does not reduce the level of this transcript. This is not observed for the MYC mRNA control. Such decay kinetics suggests that a fraction of *FXN-ett* may be resistant to degradation, perhaps owing to stable interaction with chromatin at the *FXN* locus.

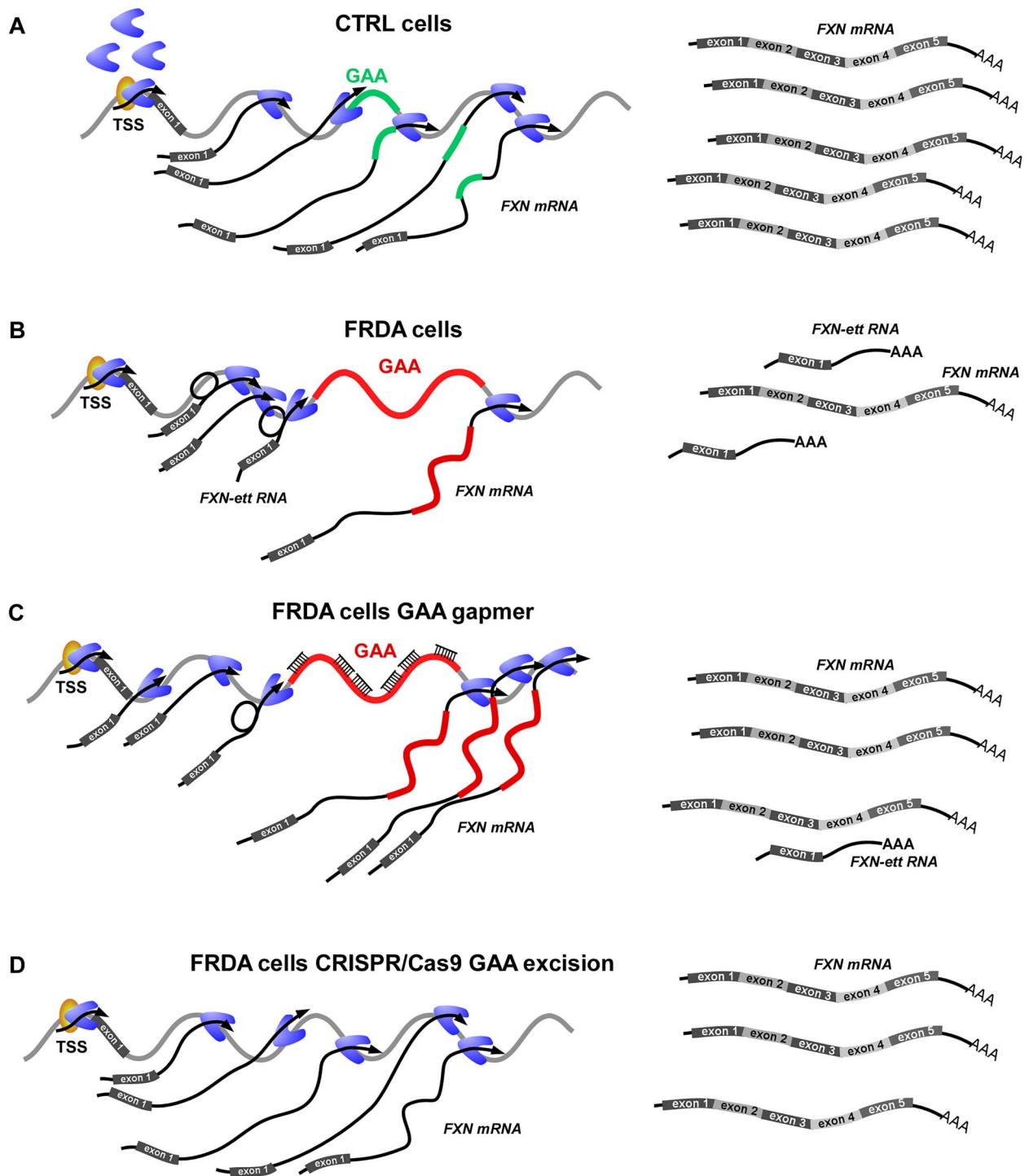
In addition to the mechanistic insight on the FRDA *FXN* transcriptional defect, *FXN-ett*, as a novel, FRDA-enriched RNA, represents a very attractive target for therapeutic intervention. Presently, we do not have evidence for a direct pathogenic role of *FXN-ett*, however formation of this stable transcript may interfere with transcription of the full-length canonical *FXN* pre-mRNA thus reducing overall transcriptional output of the *FXN* locus in FRDA cells. If *FXN-ett* forms stable interactions with chromatin, its targeting and cleavage by specifically designed gapmer ASOs could stimulate mRNA decay pathways clearing the DNA template for subsequent Pol II complexes and enhancing the probability of productive *FXN* transcription. Importantly, owing to alternative splicing, *FXN-ett* harbors a unique RNA sequence, different from the canonical *FXN* pre-mRNA, thus enabling its specific targeting. An alternative, or perhaps even more attractive therapeutic strategy, owing to the current state of the ASOs used in the clinic, is the aberrant, non-productive splicing of the *FXN* mRNA resulting in formation of *FXN-ett*. Recently, a dose-dependent increase of productive transcription and protein levels was observed after targeting different types of non-productive splicing events (63). Hence, a strategy of blocking non-productive splicing of the *FXN-ett* RNA may lead to a natural upregulation of *FXN* transcription and increase of frataxin production.

In conclusion, identification of a disease-enriched, early terminated transcript at *FXN* not only represents a significant step forward in understanding molecular pathology of the disease but also opens completely novel and disease-specific possibilities for therapeutic intervention.

## Materials and Methods

### Cell lines and cell culture conditions

Protocol for derivation of human primary fibroblasts was approved by Institutional Review Board (IRB) at the University of Alabama at Birmingham (IRB N131204003). All the human FRDA and control fibroblast lines were obtained and cultured as described before (35). Briefly, biopsy material was washed 2–3 times with ~5 ml HBSS with 1X penicillin and streptomycin (Thermo Fisher Scientific), cut into small pieces and incubated in an enzyme mixture containing Collagenase IV 1 mg/ml,



**Figure 7.** Suppressing expanded GAA-induced early transcription termination by different therapeutic strategies. **(A)** Model of FXN transcription in control cells harboring short GAA repeats. Mainly canonical, full-length FXN mRNA is synthesized. **(B)** In FRDA cells with expanded GAAs, transcription of the FXN mRNA is reduced and the level of short, early terminated FXN-ett RNA is increased. **(C)** Gapmer ASO targeting GAAs alleviates the transcription block, decreases the amount of FXN-ett RNA while elevating the level of full-length FXN mRNA. **(D)** Excision of the GAAs removes the transcriptional impediment, restores FXN mRNA synthesis and eliminates FXN-ett RNA expression.

disperse 1 mg/ml (Stem Cell Technologies) and 0.05% trypsin EDTA (Thermo Fisher Scientific) for 30 min at 37°C with gentle shaking. Digested biopsy fragments were transferred to 15 ml conical tubes. A double volume of complete media [DMEM/F12 (Thermo Fisher Scientific), 2 mM glutamine, 20% FBS (Hyclone), 1X penicillin/streptomycin and 1X of non-essential amino

acids (Thermo Fisher Scientific)] was added prior to centrifugation. Pellets were resuspended in complete media and plated onto gelatin-treated 6-well plates. Typically, outgrowths of fibroblasts were observed 7–14 days after initial plating. Established cultures were maintained in DMEM media containing 15% FBS and 1X non-essential amino acids at 37°C, 5% CO<sub>2</sub>.

Reprogramming of fibroblasts into iPSC was approved by UAB (IRB-300003993). The iPSC lines used in this study were reprogrammed using retroviral expression of reprogramming factors (FRDA 1 and CTRL 1 iPSCs) or using a Sendai virus approach (FRDA 2 and FRDA 3). Retrovirus reprogramming of fibroblasts was performed as we described before (64). In brief, fibroblasts were transduced with retroviral vectors encoding Oct3/4, Sox2, Klf-4 and c-Myc transcription factors. After 3–4 weeks of culture, iPSC colonies were manually picked and transferred to Matrigel (hESC-qualified Matrix BD)-coated 24-well plates containing mTeSR1 medium (Stem Cell Technologies) supplemented with 10  $\mu$ M ROCK inhibitor Y27632 (Stemgent). Long-term culture of iPSCs was conducted under feeder-free conditions in the mTeSR1 media according to manufacturer recommendations.

Sendai virus reprogramming of FRDA iPSCs was performed using CytoTune iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturers' instructions. 70–80% confluent fibroblast cultures were transduced with CytoTune™ 2.0 KOS, CytoTune™ 2.0 c-Myc, and the CytoTune™ 2.0 Klf4 viruses at an appropriate MOI. After 24 h media was replaced with fresh fibroblast media followed by complete media changes every other day. Seven days after transduction, cells were re-plated on vitronectin-coated plates in fresh fibroblast media. Media was exchanged 24 h later for Essential 8™ medium (Thermo Fisher Scientific) followed by daily media changes. Colonies typically appeared 16–21 days after transduction. After 21 days, colonies were manually picked and transferred to Matrigel coated 48-well plates containing mTeSR1 medium supplemented with 10  $\mu$ M ROCK inhibitor Y27632 (Stemgent). Long-term culture of iPSCs was conducted under feeder-free conditions in mTeSR1 media according to manufacturer recommendations.

Drosophila S2 cells (Thermo Fisher Scientific) used as spike-in control for PRO-seq experiments were grown in Schneider's Drosophila medium supplemented with 10% FBS at room temperature in ambient CO<sub>2</sub> as a semi-adherent monolayer in tissue culture flasks.

### RNA isolation, qRT-PCR, mRNA half-life

Total RNA from cell pellets was isolated using the RNeasy Mini Kit (Qiagen). All research involving patient/patient tissues was approved by the IRB at The University of Alabama at Birmingham (IRB Protocols: N160923005 and N160922011). Autopsy specimens of heart were obtained from the FRDA tissue repository maintained at the Veterans Affairs Medical Center in Albany, NY, USA. Frozen heart tissue was homogenized by grinding thoroughly in liquid nitrogen followed by homogenization (Dounce) 50 times in RLT buffer, then the lysate was applied to RNeasy Mini Kit to extract total RNA. All extracted RNA was treated with TURBO DNA-free kit (Thermo Fisher). The qRT-PCR reactions were performed in triplicate with the Power SYBR Green RNA-to-CT 1-Step Kit (Thermo

Fisher Scientific). Control reactions without reverse transcriptase (NoRT) were always included. Reactions were performed using StepOne Plus or ViiA 7 Real Time PCR instruments (Applied Biosystems). All primers used for qRT-PCR are listed in [Supplementary Material, Table S4](#).

For mRNA half-life analyses, cells were treated with 5  $\mu$ g/ml actinomycin D (Sigma-Aldrich). RNA was isolated at t=0, 0.5, 1, 4 and 8 h and relative expression of FXN-ett RNA was analyzed by qRT-PCR. Myc-mRNA was used as a positive control. Half-life was calculated according to (65).

### Western blot

Cell lysates were prepared using Passive Lysis Buffer (Promega) supplemented with Protease Inhibitor Cocktail (Millipore-Sigma). After three freeze–thaw cycles, the lysates were centrifuged at 13 000 g for 15 min at 4°C. Protein concentration was determined spectrophotometrically using Protein Assay Dye Reagent (Bio-Rad). Twenty micrograms of whole cell extract were electrophoresed on NuPAGE 4–12% Bis-Tris gels (Thermo Fisher Scientific) and then transferred onto 0.2  $\mu$ m nitrocellulose membrane (Bio-Rad). Membranes were stained with Ponceau S and imaged using a Chemi Doc MP Imaging System (Bio-Rad). Frataxin was detected using anti-FXN at 1:1000 (Proteintech) for 12 h at 4°C. Actin was detected using anti-ACTIN monoclonal antibody (Santa Cruz) at 1:2000 for 12 h at 4°C. Horseradish peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse immunoglobulin (GE Healthcare Life Science) and donkey anti-rabbit immunoglobulin (GE Healthcare Life Science) were used as secondary antibodies and incubated for 1 h at room temperature at 1:5000. Signal was quantified using Image Lab 6.0.1 software (Bio-Rad).

### Chromatin immunoprecipitation sequencing

Chromatin immunoprecipitation sequencing (ChIP-seq) was performed according to a previously published protocol (15) with some modifications.  $5 \times 10^6$ – $1 \times 10^7$  cells were cross-linked with 1% formaldehyde for 10 min and quenched in 125 mM glycine for 5 min at room temperature. Cells were washed twice with ice-cold PBS and collected by scraping from the cell culture dish. Nuclei were isolated by homogenizing (Dounce) 25 times in Farnham Lysis buffer (5 mM PIPES, pH 8.0, 85 mM KCl, 0.5% NP-40 and freshly added protease inhibitor cocktail) on ice. Chromatin shearing was performed using a Bioruptor XL sonicator (Diagenode) in RIPA Buffer (1X PBS, 1% NP-40, 0.5% sodium deoxycholate, 0.1% SDS and freshly added protease inhibitor cocktail). Immunoprecipitations were carried out overnight with appropriate antibodies as indicated in [Supplementary Material, Table S1](#) and Protein A/G-agarose beads (Life Technologies). The next day, beads were washed 5 times with LiCl IP wash buffer (100 mM Tris, pH 7.5, 500 mM LiCl, 1% NP-40, and 1% sodium deoxycholate) and once with TE buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.5, 0.1 mM Na<sub>2</sub>EDTA). Chromatin fragments were eluted from the beads with IP

elution buffer (1% SDS, 0.1 M NaHCO<sub>3</sub>) at 65°C. Crosslinks were reversed by overnight incubation at 65°C in the presence of 200 mM NaCl followed by 3 h treatment with 0.5 mg/ml proteinase K. DNA was purified by phenol/chloroform and precipitated with 100% ethanol in the presence of GlycoBlue (Thermo Fisher Scientific). Sequencing libraries were prepared using TruSeq ChIP Library Preparation Kit (Illumina, San Diego, CA) and sequenced on an Illumina 2500 Genetic Analyzer at the UAB Heflin Center for Genomic Sciences.

### FP and TRP drug treatment of FRDA and control iPSC

Induced pluripotent stem cells cultured to ~80% confluence were treated by (300 nM, FP) or (500 nM, TRP). DMSO was used as vehicle control. Cells were collected after 50 min of incubation by scraping on ice for PRO-seq analyses.

### Precision nuclear run-on and sequencing

PRO-seq was performed according to the previously published protocol (25) with some modifications. Cells were harvested by scraping into ice-cold PBS, collected by brief centrifugation and then resuspended in ice-cold PBS. At this point cells were counted and supplemented with 5% drosophila S2 cells as a spike-in for normalization. After centrifugation, cell pellets were resuspended in ice-cold Dounce homogenization buffer (10 mM Tris-Cl, pH 7.4, 300 mM sucrose, 3 mM CaCl<sub>2</sub>, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 5 mM DTT, protease inhibitors and 4 units per ml of RNase inhibitor). Next, cells were homogenized (Dounce) 50 times in lysis buffer on ice and nuclei were collected by centrifugation. Nuclei were washed two times with Dounce homogenization buffer. After the last wash, the supernatant was discarded and nuclei were resuspended in storage buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 25% glycerol, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM EDTA and 5 mM DTT) and snap-frozen in liquid nitrogen.

Nuclear run-on (NRO) reactions were performed by adding 100  $\mu$ l of nuclei ( $5 \times 10^6$ ) to 100  $\mu$ l of preheated (37°C) 2x NRO master mix (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 300 mM KCl, 1 mM DTT, 250  $\mu$ M ATP, 250  $\mu$ M GTP, 250  $\mu$ M UTP, 0.5  $\mu$ M CTP, 50  $\mu$ M biotin-11-CTP, and 1% Sarkosyl), and mixed by pipetting 15 times, then incubated at 37°C for 3 min. Reactions were stopped with Trizol LS, and RNA was extracted once with chloroform followed by ethanol precipitation in the presence of 1  $\mu$ l GlycoBlue. Pellets were washed with 75% ethanol once and re-dissolved in DEPC-treated H<sub>2</sub>O.

RNA fragmentation was conducted using base hydrolysis. Enrichment in RNA fragments that incorporated biotin-CTP was performed as follows: fragmented RNA samples were mixed with pre-washed streptavidin beads and incubated at room temperature for 30 min. Beads were collected using a magnetic separator, washed two-times with ice-cold high-salt wash buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 2 M NaCl and 0.5% Triton X-100 in DEPC-treated H<sub>2</sub>O), two times with binding buffer (10 mM

Tris-HCl pH 7.4, 300 mM NaCl and 0.1% Triton X-100), and once with low-salt wash buffer (5 mM Tris-HCl pH 7.4 and 0.1% Triton X-100). Next, RNA was recovered from beads using Trizol/chloroform extraction and precipitated with ethanol as described before. RNA pellets were dissolved in RNA adaptor ligation solution (10  $\mu$ M VRA3 RNA adaptor, 1 mM ATP, 10% PEG, 4 U of RNase inhibitor, 1 U of T4 RNA ligase I and 1x T4 RNA ligase buffer) and incubated 4 h at 20°C. Subsequently, a second biotin enrichment step was performed as described earlier. After precipitation, RNA pellets were dissolved in 5  $\mu$ l of DEPC-treated H<sub>2</sub>O, heat-denatured briefly at 65°C for 20 s, and placed on ice.

Next, the 5' cap was removed from RNA fragments using 5 U RNA 5' pyrophosphohydrolase, and 5' OH ends were converted to 5' phosphate by treatment with 25 U T4 polynucleotide kinase. RNA was extracted with Trizol and chloroform, precipitated and dissolved in DEPC-treated H<sub>2</sub>O. 5' RNA adaptor ligation was conducted by incubation of RNA with RNA ligation mixture (10  $\mu$ M VRA5 RNA adaptor, 1 mM ATP, 10% PEG, 4 U of RNase inhibitor, 1 U of T4 RNA ligase I and 1x T4 RNA ligase buffer) for 4 h at 20°C. This step was followed by a third biotin RNA enrichment as described before. Finally, RNA pellets were dissolved in 10  $\mu$ l DEPC-treated H<sub>2</sub>O and used for reverse transcription. 10  $\mu$ l of the RNA obtained after the third biotin-enrichment step was mixed with 1  $\mu$ l of 12.5 mM dNTPs and 0.5  $\mu$ l 100  $\mu$ M RP1 reverse-transcription primer, incubated at 70°C for 2 min and immediately transferred on ice for 2 min and supplemented with 6  $\mu$ l of RT buffer (5 mM DTT, 40 U of RNase inhibitor and 1x First-strand synthesis buffer). After 5 min incubation at 37°C, 1.5  $\mu$ l of Superscript III RT enzyme was added to a total volume of 20  $\mu$ l and reverse transcription was carried out for 15 min at 45°C, followed by 40 min at 50°C, 10 min at 55°C and 15 min at 70°C.

Next, cDNA fragments were amplified by PCR. The optimization of PCR conditions and selection of the appropriate number of cycles was performed precisely as described in (25). After optimization, a full-scale PCR amplification was performed using entire cDNA obtained in the reverse transcription step, 250  $\mu$ M dNTPs, 250 nM RP1 primer, 250 nM RPI-n primer, 2 U of Phusion DNA polymerase, 1 M betaine, 1 X HF buffer). PCR products were resolved on 8% native PAGE TBE gels. The fragment of the gel with DNA size marker was stained with ethidium bromide and based on this, PCR fragments in the range between 140 bp up to 350 bp were excised from the gel, eluted overnight in gel elution buffer (10 mM Tris-HCl, pH 8.0, 0.5 mM NH<sub>4</sub>Ac, 10 mM MgAc<sub>2</sub>, 1 mM EDTA and 0.1% SDS). Eluates were filtered through Spin-X Filters to remove gel debris, followed by phenol:chloroform extraction and ethanol precipitation. Gel-purified PCR products (PRO-seq library) were dissolved in 12  $\mu$ l H<sub>2</sub>O and sequenced at the UAB Heflin Center for Genomic Sciences using Illumina TRU-seq-compatible sequencing platform.

### Massive analysis of cDNA ends sequencing

MACE-seq was performed by the GenXPro GmbH company (Frankfurt, Germany) using the MACE-seq kit according to the instructions of the manufacturers. Briefly, 100 ng total RNA was reverse-transcribed to cDNA using an anchored oligo(dT) primer that preferentially hybridizes to the proximal end of poly(A) tails. Then, cDNA was randomly fragmented by sonication to an average size of 150 nt and a second adapter, carrying a unique molecular identifier (TrueQuant adapter), was ligated to the fragmented DNA according to manufacturer's recommendations. Using primers specific for the two adapters, cDNA molecules carrying both adapters were PCR amplified in an exponential fashion (10 cycles). Fragments of 50–300 bp were sequenced using the NextSeq500 platform (Illumina).

### 3' RACE, TA cloning and Sanger sequencing

3' RACE was performed using FirstChoice® RLM-RACE Kit (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's instructions. 1 µg of DNase-treated total RNA was reverse transcribed with M-MLV Reverse Transcriptase at 42°C for 1 h using the 3' RACE adaptor oligonucleotide. Subsequently, PCR amplification was performed with a FXN specific primer and 3' RACE adaptor primer in the following conditions: 3 min at 94°C, 35 cycles of 30 s at 94°C, 60 s at 60°C, 90 s at 72°C followed by 7 min at 72°C. Sequences of 3' RACE adaptor oligonucleotide and PCR primers are listed in [Supplementary Material, Table S4](#).

PCR products were analyzed on 1% agarose gels and selected DNA fragments were excised, purified with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), cloned into sequencing vectors using TOPO TA/Sequencing PCR4 kit (Thermo Fisher Scientific) and transformed to One Shot® Mach1™-T1R competent cells (Thermo Fisher Scientific). Plasmids carrying 3' RACE products were sequenced at the UAB Heflin Center for Genomic Sciences. Sequencing results were analyzed using SnapGene software (GSL Biotech LLC).

### CRISPR/Cas9 editing of the GAA repeats

Excision of the expanded GAA tracts from both alleles of the FXN gene (homozygous excision) was achieved using CRISPR/Cas9 editing.  $1 \times 10^6$  FRDA 2 or FRDA 3 iPSCs ([Supplementary Material, Table S2](#)) were transfected with 2 µg of pX330-U6-Chimeric\_BB-CBhhSpCas9 (Addgene #42230) encoding SpCas9 and expressing gRNAs (gUP gRNA and gDW gRNA; [Supplementary Material, Fig. S7](#)) using a Human Stem Cell Nucleofector Kit (Lonza). Three days after nucleofection, single cells were seeded at clonal density in mTeSR medium supplemented with CloneR (STEMCELL Technologies) and cultured for 4 days. Colonies were picked manually after 10–14 days. After expansion, genomic DNA was isolated from individual clones and screened for: upstream junction (UP\_jct primers); downstream junction (DW\_jct primers), upstream/downstream repaired junction (UP\_DW\_jct primers) and for the presence of

the expanded GAA repeats (GAA primers). All primers are listed in [Supplementary Material, Table S4](#); their localization and amplicon size are schematically depicted in [Supplementary Material, Figure S7](#). GAA PCR was performed as we described in (7). All other PCR reactions were conducted in a 25 µl reaction volume under the following conditions: initial denaturation 95°C for 2 min followed by 35 cycles of 95°C for 30 s, 60°C for 30 s and 72°C for 45 s, final extension 72°C for 7 min. Products were resolved on 1% agarose gels, DNA fragments were excised from the gel, purified with QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen), and then cloned and sequenced as described before ([Supplementary Material, Fig. S7](#)). Karyotype analysis was conducted by Cell Line Genetics (Madison, WI). Both heterozygous and homozygous edited clones were generated, but only homozygous were used in this study.

### Design and transfection of oligonucleotides

All gapmer oligonucleotides (sequences and modifications indicated in [Fig. 6F](#)) were gifts from Ionis Pharmaceuticals. Primary fibroblast lines were seeded on 6-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells per well 24 h before transfection. Lipofectamine 2000 (Thermo Fisher) was used to deliver oligonucleotides at 3 nM final concentration as described in (39). Transfected cells were harvested after 48 h for FXN mRNA and FXN-ett RNA expression analyses.

### Statistical analysis

When possible, a minimum of two biological replicates (different patient/control samples) or three independent experiments were conducted. For qRT-PCR experiments, three technical replicates were performed for each biological replicate and data was analyzed relative to ACT or GAPDH normalizers. Primers for all qRT-PCR reactions are listed in [Supplementary Material, Table S4](#). Statistical significance of changes observed between samples was determined by Student's t-test or analysis of variance utilizing GraphPad Prism v6. For western blots, signals were quantified using Image Lab 6.0.1 software (Bio-Rad) and shown relative to GAPDH or Ponceau S signal.

### Analysis of next-generation sequencing data

#### Pro-seq

All analyses were conducted as described in (25). Briefly, sequencing reads were filtered for read quality and collapsed to remove duplicates using the fqtrim package, with the following read parameters: -C -A -q 20 -m 80 -P33. This indicates that a read must have a minimum of 80% of its reads at a qual score greater than or equal to 80. Filtered reads were then aligned using STAR aligner (—runThreadN 20, ver 2.4.2a). The .sam output was converted to bam using samtools view -b -S, and the .bam format was converted to bed (bedtools-2.17.0). Read normalization for downstream visualization and analysis was done by using bed tools to calculate the mean read density among a subset of 581 long genes, as previously

described in (25). The .bed files were then converted to .bedgraph according to this normalization factor, converted to .tdf (IGVTools) and visualized in IGV.

### ChIP-seq

Reads were aligned using BWA 0.7.12 and filtered to remove duplicates. Minimum mapping quality was set to 30. Peaks were identified using MACS2 2.1.1. and visualized using Partek Flow (Partek).

### RNA-seq

Reads were aligned using STAR—2.5.3a and quantified with Cufflinks. Differential gene expression analysis to determine FXN mRNA levels was performed using DESeq2 3.5. Results were visualized using Partek Flow (Partek).

### MACE-seq

Analyses were conducted blindly by GenXPro GmbH. Raw data was preprocessed using Cutadapt to eliminate poly-A-tails as well as bad-quality base reads. FastQC was used to assess the quality of sequencing after trimming. Cleaned reads were mapped using Bowtie2 (66). Quantification of mapped reads to each gene was performed using HT-seq (67). ENSEMBL-GTF data was used to provide genomic locations for quantification as well as additional data for annotation (such as gene name, gene description, GO-Terms etc.). APA-determination was performed according to (68). APA sites in FXN were visualized using Partek Flow (Partek).

## Supplementary material

Supplementary Material is available at HMGJ online.

**Conflict of Interest statement.** Thazha P. Prakash and Frank Rigo are employees of Ionis Pharmaceuticals Inc. The company had no influence of performed studies, data analysis and experimental conclusions. The remaining authors declare no competing interests.

## Funding

These studies were supported by research grants from the National Institutes of Health, National Institute of Neurological Disorders and Stroke R01NS081366 and R01NS121038 (to M.N.) and by Friedreich's Ataxia Research Alliance (to M.N. and independently to J.S.N.).

## Data availability

Further information and requests for resources, data and reagents should be directed to Marek Napierala (Marek.Napierala@UTSouthwestern.edu). This study's unique/stable reagents and datasets are available with a completed Materials Transfer Agreement.

## Authors' contributions

Y.L. performed majority of the experiments and analyzed the data. J.L., S.Z. and J.S.N. performed experiments with

CRISPR/Cas9 edited iPSCs. J.W. provided mouse tissues and RNAs for analyses. T.P.P. and F.R. provided ASOs. K.G. conducted bioinformatics analyses. J.S.N. and M.N. designed experiments, acquired funding and wrote the paper. All authors read the article, contributed comments and suggestions, and approved the final version of the article.

## References

- Campuzano, V., Montermini, L., Molto, M.D., Pianese, L., Cossee, M., Cavalcanti, F., Monros, E., Rodius, F., Duclos, F., Monticelli, A. et al. (1996) Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science*, **271**, 1423–1427.
- Delatycki, M.B. and Bidichandani, S.I. (2019) Friedreich ataxia-pathogenesis and implications for therapies. *Neurobiol. Dis.*, **132**, 104606.
- Bidichandani, S.I., Ashizawa, T. and Patel, P.I. (1998) The GAA triplet-repeat expansion in Friedreich ataxia interferes with transcription and may be associated with an unusual DNA structure. *Am. J. Hum. Genet.*, **62**, 111–121.
- Cossee, M., Durr, A., Schmitt, M., Dahl, N., Trouillas, P., Allinson, P., Kostrzewa, M., Nivelon-Chevallier, A., Gustavson, K.H., Kohlschutter, A. et al. (1999) Friedreich's ataxia: point mutations and clinical presentation of compound heterozygotes. *Ann. Neurol.*, **45**, 200–206.
- Pandolfo, M. (2009) Friedreich ataxia: the clinical picture. *J. Neurol.*, **256**, 3–8.
- Koeppen, 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. et al. (2015) The pathogenesis of cardiomyopathy in Friedreich ataxia. *PLoS One*, **10**, e0116396.
- Long, A., Napierala, J.S., Polak, U., Hauser, L., Koeppen, A.H., Lynch, D.R. and Napierala, M. (2017) Somatic instability of the expanded GAA repeats in Friedreich's ataxia. *PLoS One*, **12**, e0189990.
- Pianese, L., Turano, M., Lo Casale, M.S., De Biase, I., Giacchetti, M., Monticelli, A., Criscuolo, C., Filla, A. and Coccozza, S. (2004) Real time PCR quantification of frataxin mRNA in the peripheral blood leucocytes of Friedreich ataxia patients and carriers. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*, **75**, 1061–1063.
- Filla, A., De Michele, G., Cavalcanti, F., Pianese, L., Monticelli, A., Campanella, G. and Coccozza, S. (1996) The relationship between trinucleotide (GAA) repeat length and clinical features in Friedreich ataxia. *Am. J. Hum. Genet.*, **59**, 554–560.
- Li, Y., Lu, Y., Polak, U., Lin, K., Shen, J., Farmer, J., Seyer, L., Bhalla, A.D., Rozwadowska, N., Lynch, D.R. et al. (2015) Expanded GAA repeats impede transcription elongation through the FXN gene and induce transcriptional silencing that is restricted to the FXN locus. *Hum. Mol. Genet.*, **24**, 6932–6943.
- Butler, J.S. and Napierala, M. (2015) Friedreich's ataxia—a case of aberrant transcription termination? *Transcription*, **6**, 33–36.
- Sznajder, L.J., Thomas, J.D., Carrell, E.M., Reid, T., McFarland, K.N., Cleary, J.D., Oliveira, R., Nutter, C.A., Bhatt, K., Sobczak, K. et al. (2018) Intron retention induced by microsatellite expansions as a disease biomarker. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, 4234–4239.
- Al-Mahdawi, S., Pinto, R.M., Ismail, O., Varshney, D., Lymperi, S., Sandi, C., Trabzuni, D. and Pook, M. (2008) The Friedreich ataxia GAA repeat expansion mutation induces comparable epigenetic changes in human and transgenic mouse brain and heart tissues. *Hum. Mol. Genet.*, **17**, 735–746.

14. Herman, D., Jentsch, K., Burnett, R., Soragni, E., Perlman, S.L. and Gottesfeld, J.M. (2006) Histone deacetylase inhibitors reverse gene silencing in Friedreich's ataxia. *Nat. Chem. Biol.*, **2**, 551–558.
15. Kim, E., Napierala, M. and Dent, S.Y. (2011) Hyperexpansion of GAA repeats affects post-initiation steps of FXN transcription in Friedreich's ataxia. *Nucleic Acids Res.*, **39**, 8366–8377.
16. Punga, T. and Buhler, M. (2010) Long intronic GAA repeats causing Friedreich ataxia impede transcription elongation. *EMBO Mol. Med.*, **2**, 120–129.
17. Rodden, L.N., Chutake, Y.K., Gilliam, K., Lam, C., Soragni, E., Hauser, L., Gilliam, M., Wiley, G., Anderson, M.P., Gottesfeld, J.M. et al. (2021) Methylated and unmethylated epialleles support variegated epigenetic silencing in Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.*, **29**, 3818–3829.
18. Chutake, Y.K., Lam, C., Costello, W.N., Anderson, M. and Bidichandani, S.I. (2014) Epigenetic promoter silencing in Friedreich ataxia is dependent on repeat length. *Ann. Neurol.*, **76**, 522–528.
19. Kumari, D., Biacsi, R.E. and Usdin, K. (2010) Repeat expansion affects both transcription initiation and elongation in Friedreich ataxia cells. *J. Biol. Chem.*, **286**, 4209–4215.
20. Li, J., Li, Y., Wang, J., Gonzalez, T.J., Asokan, A., Napierala, J.S. and Napierala, M. (2020) Defining transcription regulatory elements in the human Frataxin gene: implications for gene therapy. *Hum. Gene Ther.*, **31**, 839–851.
21. Jonkers, I. and Lis, J.T. (2015) Getting up to speed with transcription elongation by RNA polymerase II. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **16**, 167–177.
22. Quinodoz, M., Gobet, C., Naef, F. and Gustafson, K.B. (2014) Characteristic bimodal profiles of RNA polymerase II at thousands of active mammalian promoters. *Genome Biol.*, **15**, R85.
23. Komarnitsky, P., Cho, E.J. and Buratowski, S. (2000) Different phosphorylated forms of RNA polymerase II and associated mRNA processing factors during transcription. *Genes Dev.*, **14**, 2452–2460.
24. Mayer, A., Lidschreiber, M., Siebert, M., Leike, K., Soding, J. and Cramer, P. (2010) Uniform transitions of the general RNA polymerase II transcription complex. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, **17**, 1272–1278.
25. Mahat, D.B., Kwak, H., Booth, G.T., Jonkers, I.H., Danko, C.G., Patel, R.K., Waters, C.T., Munson, K., Core, L.J. and Lis, J.T. (2016) Base-pair-resolution genome-wide mapping of active RNA polymerases using precision nuclear run-on (PRO-seq). *Nat. Protoc.*, **11**, 1455–1476.
26. Li, J., Rozwadowska, N., Clark, A., Fil, D., Napierala, J.S. and Napierala, M. (2019) Excision of the expanded GAA repeats corrects cardiomyopathy phenotypes of iPSC-derived Friedreich's ataxia cardiomyocytes. *Stem Cell Res.*, **40**, 101529.
27. De Biase, I., Chutake, Y.K., Rindler, P.M. and Bidichandani, S.I. (2009) Epigenetic silencing in Friedreich ataxia is associated with depletion of CTCF (CCCTC-binding factor) and antisense transcription. *PLoS One*, **4**, e7914.
28. Mikaeili, H., Sandi, M., Bayot, A., Al-Mahdawi, S. and Pook, M.A. (2018) FAST-1 antisense RNA epigenetically alters FXN expression. *Sci. Rep.*, **8**, 17217.
29. Wang, M. and Marin, A. (2006) Characterization and prediction of alternative splice sites. *Gene*, **366**, 219–227.
30. Zuker, M. (2003) Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. *Nucleic Acids Res.*, **31**, 3406–3415.
31. Lynch, D.R. and Perlman, S.L. (2015) Friedreich's ataxia: the European consortium. *Lancet Neurol.*, **14**, 130–131.
32. Anjomani, Virmouni, S., Ezzatizadeh, V., Sandi, C., Sandi, M., Al-Mahdawi, S., Chutake, Y. and Pook, M.A. (2015) A novel GAA-repeat-expansion-based mouse model of Friedreich's ataxia. *Dis. Model. Mech.*, **8**, 225–235.
33. Bergquist, H., Rocha, C.S., Alvarez-Asencio, R., Nguyen, C.H., Rutland, M.W., Smith, C.I., Good, L., Nielsen, P.E. and Zain, R. (2016) Disruption of higher order DNA structures in Friedreich's ataxia (GAA)<sub>n</sub> repeats by PNA or LNA targeting. *PLoS One*, **11**, e0165788.
34. Grabczyk, E. and Usdin, K. (2000) Alleviating transcript insufficiency caused by Friedreich's ataxia triplet repeats. *Nucleic Acids Res.*, **28**, 4930–4937.
35. Li, L., Matsui, M. and Corey, D.R. (2016) Activating frataxin expression by repeat-targeted nucleic acids. *Nat. Commun.*, **7**, 10606.
36. Li, L., Shen, X., Liu, Z., Norrbom, M., Prakash, T.P., O'Reilly, D., Sharma, V.K., Damha, M.J., Watts, J.K., Rigo, F. et al. (2018) Activation of Frataxin protein expression by antisense oligonucleotides targeting the mutant expanded repeat. *Nucleic Acid Ther.*, **28**, 23–33.
37. Shen, X., Beasley, S., Putman, J.N., Li, Y., Prakash, T.P., Rigo, F., Napierala, M. and Corey, D.R. (2019) Efficient electroporation of neuronal cells using synthetic oligonucleotides: identifying duplex RNA and antisense oligonucleotide activators of human frataxin expression. *RNA*, **25**, 1118–1129.
38. Shen, X., Kilikevicius, A., O'Reilly, D., Prakash, T.P., Damha, M.J., Rigo, F. and Corey, D.R. (2018) Activating frataxin expression by single-stranded siRNAs targeting the GAA repeat expansion. *Bioorg. Med. Chem. Lett.*, **28**, 2850–2855.
39. Shen, X., Wong, J., Prakash, T.P., Rigo, F., Li, Y., Napierala, M. and Corey, D.R. (2020) Progress towards drug discovery for Friedreich's ataxia: identifying synthetic oligonucleotides that more potently activate expression of human frataxin protein. *Bioorg. Med. Chem.*, **28**, 115472.
40. Patel, M., Isaacs, C.J., Seyer, L., Brigatti, K., Gelbard, S., Strawser, C., Foerster, D., Shinnick, J., Schadt, K., Yiu, E.M. et al. (2016) Progression of Friedreich ataxia: quantitative characterization over 5 years. *Ann. Clin. Transl. Neurol.*, **3**, 684–694.
41. Khristich, A.N., Armenia, J.F., Matera, R.M., Kolchinski, A.A. and Mirkin, S.M. (2020) Large-scale contractions of Friedreich's ataxia GAA repeats in yeast occur during DNA replication due to their triplex-forming ability. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **117**, 1628–1637.
42. Sakamoto, N., Chastain, P.D., Parniewski, P., Ohshima, K., Pandolfo, M., Griffith, J.D. and Wells, R.D. (1999) Sticky DNA: self-association properties of long GAA.TTC repeats in R.R.Y triplex structures from Friedreich's ataxia. *Mol. Cell*, **3**, 465–475.
43. Zhang, J., Fakharzadeh, A., Pan, F., Roland, C. and Sagui, C. (2020) Atypical structures of GAA/TTC trinucleotide repeats underlying Friedreich's ataxia: DNA triplexes and RNA/DNA hybrids. *Nucleic Acids Res.*, **48**, 9899–9917.
44. Grabczyk, E., Mancuso, M. and Sammarco, M.C. (2007) A persistent RNA-DNA hybrid formed by transcription of the Friedreich ataxia triplet repeat in live bacteria, and by T7 RNAP in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **35**, 5351–5359.
45. Groh, M., Lufino, M.M., Wade-Martins, R. and Gromak, N. (2014) R-loops associated with triplet repeat expansions promote gene silencing in Friedreich ataxia and fragile X syndrome. *PLoS Genet.*, **10**, e1004318.
46. Hartono, S.R., Malapert, A., Legros, P., Bernard, P., Chedin, F. and Vanoosthuyse, V. (2018) The affinity of the S9.6 antibody for double-stranded RNAs impacts the accurate mapping of R-loops in fission yeast. *J. Mol. Biol.*, **430**, 272–284.



47. Konig, F., Schubert, T. and Langst, G. (2017) The monoclonal S9.6 antibody exhibits highly variable binding affinities towards different R-loop sequences. *PLoS One*, **12**, e0178875.
48. Vanoosthuyse, V. (2018) Strengths and weaknesses of the current strategies to map and characterize R-loops. *Noncoding RNA*, **4**, 9.
49. Aguilera, A. and Garcia-Muse, T. (2012) R loops: from transcription byproducts to threats to genome stability. *Mol. Cell*, **46**, 115–124.
50. Bacolla, A., Wang, G. and Vasquez, K.M. (2015) New perspectives on DNA and RNA triplexes as effectors of biological activity. *PLoS Genet.*, **11**, e1005696.
51. Crossley, M.P., Bocek, M. and Cimprich, K.A. (2019) R-loops as cellular regulators and genomic threats. *Mol. Cell*, **73**, 398–411.
52. Keenen, M.M., Brown, D., Brennan, L.D., Renger, R., Khoo, H., Carlson, C.R., Huang, B., Grill, S.W., Narlikar, G.J. and Redding, S. (2021) HP1 proteins compact DNA into mechanically and positionally stable phase separated domains. *elife*, **10**, e64563.
53. Larson, A.G., Elnatan, D., Keenen, M.M., Trnka, M.J., Johnston, J.B., Burlingame, A.L., Agard, D.A., Redding, S. and Narlikar, G.J. (2017) Liquid droplet formation by HP1alpha suggests a role for phase separation in heterochromatin. *Nature*, **547**, 236–240.
54. Strom, A.R., Emelyanov, A.V., Mir, M., Fyodorov, D.V., Darzacq, X. and Karpen, G.H. (2017) Phase separation drives heterochromatin domain formation. *Nature*, **547**, 241–245.
55. Peng, L., Li, E.M. and Xu, L.Y. (2020) From start to end: phase separation and transcriptional regulation. *Biochim Biophys Acta Gene Regul Mech*, **1863**, 194641.
56. Lin, H., Magrane, J., Rattelle, A., Stepanova, A., Galkin, A., Clark, E.M., Dong, Y.N., Halawani, S.M. and Lynch, D.R. (2017) Early cerebellar deficits in mitochondrial biogenesis and respiratory chain complexes in the KIKO mouse model of Friedreich ataxia. *Dis. Model. Mech.*, **10**, 1343–1352.
57. Bentley, D.L. (2014) Coupling mRNA processing with transcription in time and space. *Nat. Rev. Genet.*, **15**, 163–175.
58. Burnett, R., Melander, C., Puckett, J.W., Son, L.S., Wells, R.D., Dervan, P.B. and Gottesfeld, J.M. (2006) DNA sequence-specific polyamides alleviate transcription inhibition associated with long GAA.TTC repeats in Friedreich's ataxia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **103**, 11497–11502.
59. Lev Maor, G., Yearim, A. and Ast, G. (2015) The alternative role of DNA methylation in splicing regulation. *Trends Genet.*, **31**, 274–280.
60. Maunakea, A.K., Chepelev, I., Cui, K. and Zhao, K. (2013) Intragenic DNA methylation modulates alternative splicing by recruiting MeCP2 to promote exon recognition. *Cell Res.*, **23**, 1256–1269.
61. Kamieniarz-Gdula, K. and Proudfoot, N.J. (2019) Transcriptional control by premature termination: a forgotten mechanism. *Trends Genet.*, **35**, 553–564.
62. Steurer, B., Janssens, R.C., Geverts, B., Geijer, M.E., Wienholz, F., Theil, A.F., Chang, J., Dealy, S., Pothof, J., van Cappellen, W.A. et al. (2018) Live-cell analysis of endogenous GFP-RPB1 uncovers rapid turnover of initiating and promoter-paused RNA polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **115**, E4368–E4376.
63. Lim, K.H., Han, Z., Jeon, H.Y., Kach, J., Jing, E., Weyn-Vanhenhenryck, S., Downs, M., Corrionero, A., Oh, R., Scharner, J. et al. (2020) Antisense oligonucleotide modulation of non-productive alternative splicing upregulates gene expression. *Nat. Commun.*, **11**, 3501.
64. Polak, U., Hirsch, C., Ku, S., Gottesfeld, J.M., Dent, S.Y.R. and Napierala, M. (2012) Selecting and isolating colonies of human induced pluripotent stem cells reprogrammed from adult fibroblasts. *J. Vis. Exp.*, **60**, e3416. <https://doi.org/10.3791/3416>.
65. Clement, S.L. and Lykke-Andersen, J. (2008) A tethering approach to study proteins that activate mRNA turnover in human cells. *Methods Mol Biol.*, **419**, 121–133.
66. Langmead, B. and Salzberg, S.L. (2012) Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods*, **9**, 357–359.
67. Anders, S., Pyl, P.T. and Huber, W. (2015) HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics*, **31**, 166–169.
68. Muller, S., Rycak, L., Afonso-Grunz, F., Winter, P., Zawada, A.M., Damrath, E., Scheider, J., Schmah, J., Koch, I., Kahl, G. et al. (2014) APADB: a database for alternative polyadenylation and microRNA regulation events. *Database (Oxford)*, **2014**.