



Universitat Autònoma de Barcelona

**ADVERTIMENT.** L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  [http://cat.creativecommons.org/?page\\_id=184](http://cat.creativecommons.org/?page_id=184)

**ADVERTENCIA.** El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

**WARNING.** The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma  
de Barcelona**

**DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA MOLECULAR**

**FACULTAT DE VETERINÀRIA**

**CENTRE DE BIOTECNOLOGIA ANIMAL I TERÀPIA GÈNICA**

**DESENVOLUPAMENT D'UNA APROXIMACIÓ DE  
TERÀPIA GÈNICA PEL TRACTAMENT DE LA  
MALALTIA DE NIEMANN-PICK TIPUS C2**

**XAVIER SÁNCHEZ MORENO**



La present tesi doctoral s'ha dut a terme sota la direcció de la Dra. Fàtima Bosch i Tubert i la Dra. Sara Marcó Costa al Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Facultat de Veterinària i al Centre de Biotecnologia Animal i Teràpia Gènica (CBATEG).

**XAVIER SÁNCHEZ MORENO**

**FÀTIMA BOSCH I TUBERT**

**SARA MARCÓ COSTA**

**SETEMBRE 2020**

BELLATERRA



*A la meva família*



Bé, aquesta ha estat sens dubte una de les etapes més intenses de la meua vida. I, de cop i volta, sembla que està arribant al final. Han estat uns anys de molts canvis, de moltes experiències. Al CBATEG hi he trobat una gran família, que m'ha acompanyat en aquest procés i que m'ha guiat. Us ho agraeixo moltíssim, aquesta tesi ha estat possible gràcies a la vostra ajuda.

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

Moltes gràcies també a la meua co-directora, la Sara. Ha estat un projecte ple de reptes, moltes alegries i algun maldecap, amb el que he après molt al teu costat. Moltes gràcies per ser-hi quan ho necessitava, per la confiança i per la motivació per seguir endavant!





<b>24-HC</b>	24-hidroxicolesterol
<b>4MU</b>	4-metilumebeliferona
<b>aa</b>	Aminoàcid
<b>AAP</b>	Proteïna activadora de l'assemblatge ( <i>Assembly-Activating Protein</i> )
<b>AAV</b>	Virus o vector adeno-associat
<b>ABCA1</b>	Transportador dependent d'ATP A1 ( <i>ATP-binding cassette sub-family A member 1</i> )
<b>ABCG1</b>	Transportador dependent d'ATP G1 ( <i>ATP-binding cassette sub-family G member 1</i> )
<b>ABCG4</b>	Transportador dependent d'ATP G4 ( <i>ATP-binding cassette sub-family G member 4</i> )
<b>AG</b>	Aparell de Golgi
<b>ANOVA</b>	Anàlisi de la variància
<b>apoA1</b>	Apolipoproteïna A1
<b>apoE</b>	Apolipoproteïna E
<b>AST</b>	Aspartat-aminotransferasa
<b>ATP</b>	Adenosina trifosfat
<b>BCA</b>	Àcid biocinconínic
<b>BHE</b>	Barrera hematoencefàlica
<b>BMP</b>	Bis(monoacilglicero)fosfat
<b>bp</b>	Parells de bases
<b>BSA</b>	Albúmina sèrica bovina ( <i>Bovine Serum Albumin</i> )
<b>BSIB4</b>	Isolectina B4 de la <i>Griffonia simplicifolia</i>
<b>C-triol</b>	Colestan-3b, 5a, 6b-triol
<b>CAG</b>	Promotor híbrid format pel potenciador de la transcripció del citomegalovirus, el promotor de la $\beta$ -actina i el primer intró del gen de la $\beta$ -globina humana
<b>CBATEG</b>	Centre de Biotecnologia Animal i de Teràpia Gènica
<b>cDNA</b>	DNA complementari
<b>cds</b>	Seqüència codificant ( <i>Coding Sequence</i> )
<b>CETP</b>	Proteïna transferidora d'èsters del colesterol ( <i>Cholesteryl Ester Transfer Protein</i> )
<b>CLN</b>	Lipofucsinosi ceroide neuronal
<b>cM</b>	Centimorgans
<b>CYP7A1</b>	Citocrom P450 7A1
<b>d</b>	Dia

<b>DBS</b>	Sang seca recollida en un paper ( <i>Dried Blood Spot</i> )
<b>DNA</b>	Àcid desoxiribonucleic
<b>dNTP</b>	Desoxinucleòsid trifosfat
<b>ERO</b>	Espècies reactives de l'oxigen
<b>g</b>	Gram
<b>g</b>	Força g
<b>GalCerS</b>	2-hidroxiacilesfingosina 1- $\beta$ -galactosiltransferasa ( <i>2-hydroxyacyl-sphingosine 1-beta-galactosyltransferase</i> )
<b>GFAP</b>	Proteïna àcida fibril·lar glial ( <i>Glial Fibrillary Acidic Protein</i> )
<b>H</b>	Hora
<b>HDL</b>	Lipoproteïna d'alta densitat
<b>HGSNAT</b>	Heparà $\alpha$ -glucosaminida N-acetiltransferasa
<b>HMG-CoA</b>	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
<b>HMGCR</b>	HMG-CoA Reductasa
<b>HPBCD</b>	2-hidroxiopropil-b-ciclodextrina
<b>IC</b>	Intracisterna
<b>IMPC</b>	<i>International Mouse Phenotyping Consortium</i>
<b>INSIG</b>	Proteïna del gen induït per insulina 1 ( <i>Insulin-Induced Gene 1 protein</i> )
<b>IRES</b>	Lloc intern d'entrada del ribosoma ( <i>Internal Ribosomal Entry Site</i> )
<b>ITR</b>	Repeticions terminals invertides ( <i>Inverted Terminal Repeats</i> )
<b>IV</b>	Intravenosa
<b>kb</b>	Kilo parell de bases
<b>kDa</b>	Kilodalton
<b>kg</b>	Kilogram
<b>KO</b>	<i>Knock-out</i>
<b>L</b>	Litre
<b>LAL</b>	Lipasa Àcida Lisosòmica ( <i>Lysosomal Acid Lipase</i> )
<b>LAMP2</b>	Proteïna lisosòmica associada a la membrana 2 ( <i>Lysosomal Associated Membrane Protein 2</i> )
<b>LC3B</b>	Cadena lleugera 3B de la proteïna associada als microtúbuls 1A/1B ( <i>microtubule-associated protein 1A/1B Light Chain 3B</i> )
<b>LCR</b>	Líquid cefalorraquidi
<b>LDL</b>	Lipoproteïna de baixa densitat
<b>LDLR</b>	Receptor de l'LDL

<b>LIMP2</b>	Proteïna lisosòmica integral de membrana 2 ( <i>Lysosomal Integral Membrane Protein 2</i> )
<b>LRP</b>	<i>LDLR-Related Protein</i>
<b>LSD</b>	Malaltia d'acumulació lisosòmica ( <i>Lysosomal Storage Disease</i> )
<b>LXR</b>	Receptor hepàtic X ( <i>Liver X Receptor</i> )
<b>LXRE</b>	<i>LXR-Responsive Element</i>
<b>Lyso-SM</b>	Esfingosil-fosforilcolina o Lyso-esfingomielina
<b>Lyso-SM-509</b>	Lyso-esfingomielina-509
<b>M6P</b>	Mannosa-6-fosfat
<b>Mac-2</b>	Galectina-3
<b>MAG</b>	Glicoproteïna associada a la mielina ( <i>Myelin-Associated Glycoprotein</i> )
<b>MET</b>	Microscòpia electrònica de transmissió
<b>mg</b>	Mil·ligram
<b>min</b>	minut
<b>ml</b>	Mil·lilitre
<b>mM</b>	Mil·limolar
<b>MPR</b>	Receptor de la Manosa-6-fosfat
<b>MPS</b>	Mucopolisacaridosi
<b>mRNA</b>	Àcid ribonucleic missatger
<b>ng</b>	Nanogram
<b>nm</b>	Nanòmetre
<b>NPA</b>	Malaltia de Niemann-Pick Tipus A
<b>NPB</b>	Malaltia de Niemann-Pick Tipus B
<b>NPC1</b>	Niemann-Pick C1
<b>NPC1L1</b>	<i>Niemann-Pick C1-Like 1</i>
<b>NPC2</b>	Niemann-Pick C2
<b>o/n</b>	<i>over night</i>
<b>°C</b>	Grau cèlsius
<b>ORF</b>	Marc obert de lectura ( <i>Open Reading Frame</i> )
<b>p</b>	Valor p
<b>p/v</b>	pes/volum
<b>PBS</b>	Tampó fosfat salí ( <i>Phosphate-Buffered Saline</i> )
<b>PCR</b>	Reacció en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
<b>PEG</b>	Polietilè glicol
<b>PFA</b>	Paraformaldehid

<b>PLP1</b>	Proteïna proteolipina 1 ( <i>Proteolipin Protein 1</i> )
<b>PNH</b>	Primats no humans
<b>PoliA</b>	Senyal de poliadenilació
<b>QM</b>	Quilomicró
<b>qPCR</b>	PCR quantitativa
<b>RB</b>	<i>Roller bottles</i>
<b>RE</b>	Reticle endoplasmàtic
<b>RNA</b>	Àcid ribonucleic
<b>rpm</b>	Revolucions per minut
<b>RT-PCR</b>	PCR amb la transcriptasa inversa
<b>s</b>	Segon
<b>S1P</b>	<i>Site-1 protease</i>
<b>S2P</b>	<i>Site-2 protease</i>
<b>SCAP</b>	Proteïna activadora per tall de les SREBP ( <i>SREBP Cleavage-Activating Protein</i> )
<b>SEM</b>	Error estàndard de la mitjana ( <i>Standard Error Mean</i> )
<b>SNC</b>	Sistema nerviós central
<b>SNP</b>	Sistema nerviós perifèric
<b>SPF</b>	Lliure de patògens específics ( <i>Specific-Pathogen-Free</i> )
<b>SRB1</b>	<i>Scavenger Receptor class B type 1</i>
<b>SRE</b>	Element regulador dels esterols ( <i>Sterol Regulatory Element</i> )
<b>SREBP</b>	Proteïna d'unió a l'element regulador dels esterols ( <i>Sterol Regulatory Element Binding Protein</i> )
<b>SSD</b>	Domini sensor d'esterols ( <i>Sterol Sensing Domain</i> )
<b>U</b>	Unitat
<b>UAB</b>	Universitat Autònoma de Barcelona
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	volum/volum
<b>vg</b>	Genomes virals ( <i>Viral Genomes</i> )
<b>WT</b>	Ratolí control/sa ( <i>Wild-type</i> )
<b>β-HEXO</b>	β-Hexosaminidasa
<b>µg</b>	Microgram
<b>µl</b>	Microlitre
<b>µm</b>	Micròmetre

<b>I. Presentació.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Introducció .....</b>	<b>5</b>
<b>1. MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA.....</b>	<b>7</b>
1.1. Lisosomes i enzims lisosòmics.....	7
1.2. Malalties d'acumulació lisosòmica.....	10
<b>2. NIEMANN-PICK TIPUS C2.....</b>	<b>13</b>
2.1. Incidència de la NPC2.....	13
2.2. Característiques moleculars de la NPC2 .....	14
2.2.1. Gen NPC2.....	14
2.2.2. Proteïna NPC2 .....	15
2.2.3. Mutacions al gen NPC2.....	16
2.2.4. Correlació genotip-fenotip .....	18
2.3. Metabolisme del colesterol .....	18
2.3.1. Estructura i funció del colesterol.....	18
2.3.2. Fonts de colesterol i vies de transport a l'organisme .....	19
2.3.3. Transport del colesterol al compartiment endo-lisosòmic.....	22
2.3.4. Metabolisme del colesterol al SNC.....	23
2.4. Acumulació de lípids a la NPC2 .....	25
2.5. Fisiopatologia de la NPC2 .....	26
2.6. Descripció clínica de la NPC2 .....	29
2.6.1. Classificació clínica de la NPC .....	29
2.6.2. Patologia neurològica i psiquiàtrica .....	31
2.6.3. Patologia perifèrica.....	32
2.7. Diagnòstic de la NPC .....	33
2.8. Models animals de la NPC2 .....	35
2.8.1. Model murí de la NPC2 .....	35
2.8.2. Model felí de la NPC2 .....	35
2.9. Tractaments per a la NPC2 .....	36
2.9.1. Tractament simptomàtic .....	36
2.9.2. Teràpia de reducció de substrat .....	37
2.9.3. Transplantament de medul·la òssia.....	39
<b>3. TERÀPIA GÈNICA.....</b>	<b>41</b>
3.1. Classificació dels tipus de teràpia gènica .....	41
3.2. Vectors virals adenoassociats .....	42
3.2.1. Biologia dels virus adenoassociats.....	42

3.2.2. Producció dels vectors AAV recombinants .....	44
<b>III. Objectius.....</b>	<b>49</b>
<b>IV. Resultats .....</b>	<b>53</b>
<b>Part 1. Caracterització del model murí de la NPC2 .....</b>	<b>55</b>
<b>1. CARACTERITZACIÓ GENERAL DEL RATOLÍ MODEL DE LA NPC2</b> .....	<b>57</b>
1.1. Expressió del mRNA i de la proteïna NPC2.....	57
1.2. Anàlisi de les proporcions genotípiques .....	59
1.3. Pes corporal .....	60
1.4. Supervivència.....	60
<b>2. ESTUDI DE LA PATOLOGIA AL SNC .....</b>	<b>62</b>
2.1. Acumulació de colesterol.....	62
2.2. Homeòstasi lisosòmica.....	63
2.2.1. Distensió lisosòmica.....	63
2.2.2. Desregulació enzimàtica .....	65
2.2.3. Defectes de l'autofàgia .....	66
2.3. Desmielinització .....	67
2.4. Patologia del cerebel.....	68
2.5. Neuroinflamació .....	71
<b>3. ESTUDI DE LA PATOLOGIA ALS TEIXITS PERIFÈRICS DEL</b> <b>RATOLÍ MODEL DE LA NPC2 .....</b>	<b>74</b>
3.1. Acumulació de colesterol.....	74
3.2. Distensió lisosòmica.....	75
3.3. Inflamació als teixits perifèrics .....	77
3.4. Hepatosplenomegàlia.....	79
3.5. Homeòstasi lisosòmica.....	80
3.5.1. Alteracions patològiques al fetge.....	80
3.5.2. Alteració de l'activitat $\beta$ -HEXO al sèrum.....	81
3.6. Dany hepàtic .....	82
<b>4. AVALUACIÓ DEL COMPORTAMENT .....</b>	<b>84</b>
4.1. Prova de l'actímetre .....	84
4.2. Prova del <i>rotarod</i> i <i>mesh test</i> .....	87

<b>Part 2. Desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica per a la NPC2 .....</b>	<b>89</b>
<b>1. CONSTRUCCIÓ DEL VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT DE SEROTIP 9 CODIFICANT PER LA PROTEÏNA NPC2 .....</b>	<b>91</b>
<b>2. DISSENY EXPERIMENTAL.....</b>	<b>92</b>
<b>3. AVALUACIÓ GENERAL DE L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB L'AAV9-Npc2.....</b>	<b>94</b>
3.1. Expressió del mRNA <i>omNpc2</i> i de la proteïna NPC2 .....	94
3.2. Pes corporal .....	96
3.3. Supervivència.....	97
<b>4. EFICÀCIA DEL TRACTAMENT AMB L'AAV9-Npc2 A LA PATOLOGIA DEL SNC .....</b>	<b>100</b>
4.1. Reducció de l'acumulació de colesterol no esterificat.....	100
4.2. Homeòstasi lisosòmica.....	102
4.2.1. Distensió lisosòmica.....	102
4.2.2. Desregulació enzimàtica .....	104
4.2.3. Defectes de l'autofàgia .....	105
4.3. Desmielinització .....	106
4.4. Patologia del cerebel.....	107
4.5. Neuroinflamació .....	111
<b>5. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB L'AAV9-Npc2 A LA PATOLOGIA DELS TEIXITS PERIFÈRICS .....</b>	<b>115</b>
5.1. Acumulació de colesterol.....	115
5.2. Distensió lisosòmica.....	116
5.3. Inflamació als teixits perifèrics .....	119
5.4. Hepatosplenomegàlia.....	122
5.5. Homeòstasi lisosòmica.....	123
5.5.1. Enzims lisosòmics al fetge .....	123
5.5.2. Alteració de l'activitat $\beta$ -HEXO al sèrum.....	124
<b>6. AVALUACIÓ DEL COMPORTAMENT .....</b>	<b>125</b>
6.1. Prova de l'actímetre .....	125
6.2. Prova del <i>mesh test</i> i del <i>rotarod</i> .....	126
<b>V. Discussió.....</b>	<b>129</b>
<b>VI. Conclusions .....</b>	<b>143</b>



<b>VII. Materials i mètodes.....</b>	<b>147</b>
<b>7. MATERIALS .....</b>	<b>149</b>
7.1. Animals .....	149
7.2. Soques bacterianes.....	150
7.3. Anticossos.....	150
7.4. Plasmidis.....	151
7.5. Reactius .....	152
<b>8. MÈTODES .....</b>	<b>153</b>
8.1. Genotipatge dels ratolins NPC2 .....	153
8.1.1. Aïllament del DNA genòmic.....	153
8.1.2. Genotipatge per PCR .....	153
8.2. Tècniques de manipulació del DNA.....	154
8.2.1. Preparació del DNA plasmídic.....	154
8.2.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció.....	155
8.2.3. Desfosforilació dels fragments de DNA .....	155
8.2.4. Generació d'extrems roms .....	155
8.2.5. Lligació dels fragments de DNA .....	156
8.2.6. Transformació de les cèl·lules competents.....	156
8.2.7. Purificació i resolució del DNA .....	156
8.3. Tècniques d'obtenció i manipulació del RNA.....	157
8.3.1. Aïllament i purificació de RNA total .....	157
8.3.2. Síntesi del cDNA .....	157
8.3.3. Quantificació de l'expressió del mRNA per qPCR .....	158
8.4. Transfecció de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic .....	159
8.5. Producció, purificació i titulació de vectors virals adenoassociats .....	159
8.5.1. Producció i purificació .....	159
8.5.2. Titulació de genomes virals .....	161
8.5.3. Quantificació de partícules virals .....	162
8.6. Administració <i>in vivo</i> dels vectors AAV.....	163
8.6.1. Administració intracisterna magna dels vectors AAV9 a ratolins .....	163
8.6.2. Administració intravenosa dels vectors AAV9 a ratolins	164
8.7. Eutanàsia i obtenció de mostres biològiques <i>post mortem</i> de ratolins .....	164

---

8.8. Quantificació de genomes virals als teixits .....	165
8.9. Western blot .....	166
8.9.1. Quantificació del contingut proteic pel mètode del BCA	166
8.9.2. Electroforesi en gels d'acrilamida (SDS-PAGE) .....	166
8.9.3. Electrotransferència de les proteïnes a la membrana de PVDF .....	167
8.9.4. Incubació i revelat .....	167
8.10. Determinació de les activitats enzimàtiques .....	168
8.10.1. Quantificació del contingut proteic pel mètode del Bradford .....	168
8.11. Determinació de l'activitat $\beta$ -HEXO i HGSNAT .....	168
8.12. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs de <i>parafina</i> .....	169
8.13. Determinació de l'àrea positiva de les immunohistoquímiques de camp clar.....	169
8.14. Tinció amb complex de filipina.....	169
8.15. Microscòpia electrònica de transmissió .....	170
8.16. Determinació del contingut de colesterol al sèrum i als teixits	170
8.17. Determinació de la transaminasa AST al sèrum.....	171
8.18. Proves de comportament .....	171
8.18.1. Actímetre.....	171
8.18.2. Rotarod .....	171
8.18.3. Mesh test .....	172
8.19. Anàlisi estadística.....	172
<b>VI. Bibliografia.....</b>	<b>173</b>



## ***I. Presentació***



La malaltia de Niemann-Pick tipus C2 (NPC2) és una malaltia minoritària d'acumulació lisosòmica causada per la deficiència de la proteïna NPC2, implicada en el transport i sortida del colesterol no esterificat del compartiment endo-lisosòmic. La deficiència d'aquesta proteïna provoca l'acumulació patològica del colesterol no esterificat als lisosomes, fet que dona lloc a la disfunció i mort cel·lular tant al sistema nerviós central (SNC) com als teixits perifèrics. Es tracta d'una malaltia neurodegenerativa, severa i progressiva, que es caracteritza principalment per l'atàxia cerebel·losa, la disfàgia, la disàrtria, l'oftalmoplegia vertical supranuclear i la demència. Comparativament, la patologia als òrgans perifèrics és més lleu i inclou, habitualment, l'hepatosplenomegàlia. L'edat d'aparició dels primers símptomes és força heterogènia, ja que pot ser des de poc després del naixement fins a l'edat adulta. Generalment, els pacients moren entre la primera i la segona dècada de vida.

Actualment, només es disposa d'un tractament aprovat comercialment per a la malaltia de NPC2, el miglustat. Aquest fàrmac únicament permet establir i endarrerir la progressió de la malaltia als pacients pediàtrics, però no presenta una elevada eficàcia terapèutica als pacients de presentació juvenil i adulta de la malaltia. A més a més, alguns dels inconvenients que presenta són que no tracta tot l'espectre fenotípic de la malaltia i que calen administracions periòdiques als pacients, ja que no és un tractament enfocat a resoldre el problema genètic. Així doncs, actualment és necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques més eficaces que permetin tractar tot l'espectre fenotípic de la malaltia. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors virals adenoassociats (AAV) representa una alternativa molt prometedora per al tractament de les malalties monogèniques, com la NPC2, ja que una única administració del vector permet introduir una còpia corregida del gen mutat que donarà lloc a una expressió estable del transgèn, amb un perfil de seguretat excel·lent.

Per tant, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral va ser el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica basada en l'administració al líquid cefaloraquídi (LCR) d'un vector AAV de serotip 9 (AAV9) codificant per la proteïna NPC2 per al tractament de la malaltia de NPC2. Els vectors AAV9 presenten un ampli tropisme pel SNC, el principal òrgan afectat a la malaltia de NPC2, i també són capaços de drenar des del LCR cap al torrent sanguini i transduir eficientment el fetge, principal bomba secretora de la proteïna als teixits perifèrics. En primer lloc, abans de testar aquesta estratègia terapèutica, es va caracteritzar un nou ratolí model de la malaltia, *knock-out* per al gen *Npc2*, que va mostrar un fenotip molt sever i agressiu. Aquest model de ratolí recapitulava les principals alteracions patològiques que presentaven els pacients humans, com l'acumulació del colesterol, la neurodegeneració progressiva i la

hipomielinització. A més a més, el model també va presentar problemes locomotors i de la coordinació, així com també una pèrdua progressiva del pes corporal i una reducció dràstica de l'esperança de vida.

La segona part d'aquesta tesi doctoral es va centrar en demostrar l'eficàcia terapèutica del disseny de teràpia gènica per a la NPC2, on es va analitzar l'efecte de l'edat d'injecció dels ratolins, de la dosi del vector administrada al LCR per via intracisterna magna (IC) i de la co-administració del vector per via intravenosa (IV). Els resultats de l'estudi van demostrar que l'administració del vector AAV9-*Npc2* a una dosi d' $1 \times 10^{11}$ vg per via IC als ratolins de 18 dies d'edat, quan la patologia ja estava ben establerta, va resultar en una molt bona eficàcia terapèutica que millorava tant les principals característiques de la patologia del SNC, com també la dels òrgans i teixits perifèrics. Així doncs, el tractament va permetre l'expressió de la proteïna NPC2 al SNC, fet que va conduir a una reducció molt marcada de l'acumulació del colesterol no esterificat a l'encèfal. Conseqüentment, es va observar una millora de la patologia lisosòmica, un increment de la mielinització i de la supervivència de les cèl·lules de Purkinje i també a una correcció de la neuroinflamació. A més a més, part del vector va drenar des del LCR cap a la torrent sanguini i va transduir de forma eficient el fetge, sense la necessitat de co-administrar el vector per via IV. L'expressió hepàtica de la proteïna NPC2 fins a nivells suprafisiològics va permetre la correcció de la patologia als òrgans perifèrics, gràcies al fenomen de la correcció creuada, on la proteïna secretada al torrent sanguini pot ser recaptada per altres teixits que no expressen la proteïna. El tractament amb AAV9-*Npc2* també va resultar en una millora dels problemes locomotors i de la coordinació i un increment del pes corporal, així com també a un augment substancial de la supervivència dels ratolins, pràcticament indistingible dels ratolins WT.

En conjunt, aquests resultats van demostrar l'eficàcia terapèutica de l'administració al LCR dels vectors AAV9 codificants per la proteïna NPC2 per a revertir les alteracions patològiques a un model molt sever de la malaltia de NPC2. Així doncs, aquest estudi suposa una base sòlida per a la translació clínica d'aquesta aproximació de teràpia gènica per al tractament dels pacients de la malaltia de NPC2.

## ***II. Introducció***





## 1. MALALTIES D'ACUMULACIÓ LISOSÒMICA

Les malalties d'acumulació lisosòmica (LSD, *Lysosomal Storage Disease*) són un conjunt de malalties minoritàries caracteritzades per l'acumulació intra-lisosòmica de diverses macromolècules no degradades a causa de la deficiència d'alguna proteïna lisosòmica.

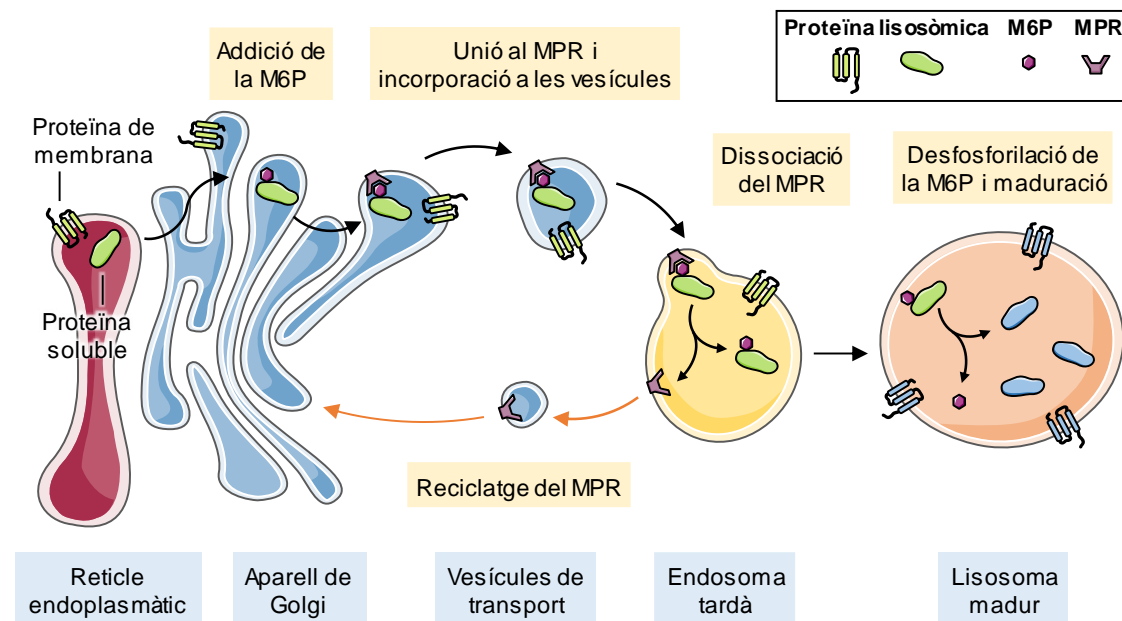
### 1.1. Lisosomes i enzims lisosòmics

Els lisosomes són uns orgànuls intracel·lulars recoberts per una bicapa lipídica presents a les cèl·lules animals, que van ser descrits per primera vegada pel Christian de Duve l'any 1955 (*De Duve, 1955*). Aquest orgànu l és un dels centres catabòlics més importants de la cèl·lula, ja que participa en el reciclatge i la degradació de macromolècules d'origen intra o extracel·lular (*Saftig, 2009; Appelqvist, 2013*). Els lisosomes tenen un pH luminal de 4.5-5, un ambient àcid que es manté gràcies a les bombes de protons transmembrana de tipus H<sup>+</sup>-ATPasa i que les hidrolases lisosòmiques necessiten per dur a terme la seva funció (*Lawrence, 2019*). A part d'aquesta funció catabòlica, els lisosomes també participen en altres processos fisiològics com: l'homeòstasi del colesterol, la reparació de la membrana plasmàtica, la defensa contra patògens, la remodelació òssia, la senyalització cel·lular i l'apoptosi (*Saftig, 2009*).

Hi ha dos tipus de proteïnes indispensables pel funcionament del lisosoma: les solubles i les de membrana. La majoria de proteïnes solubles són hidrolases àcides, de les quals se'n coneixen més de 50, amb activitats enzimàtiques de tipus fosfatasa, lipasa, peptidasa, nucleasa, sulfatasa, glucosidasa, entre d'altres (*Makrypidi, 2012*). També hi ha proteïnes solubles sense activitat enzimàtica com ara la NPC2, un translocador del colesterol, o les saposines, que faciliten la interacció del substrat amb la hidrolasa (*Braulke, 2009*). Les proteïnes de membrana, unes 25 aproximadament, estan majoritàriament implicades en processos de senyalització, fusió de membranes, acidificació del lumen lisosòmic i transport d'ions i molècules (*Saftig, 2009; Lawrence, 2019*).

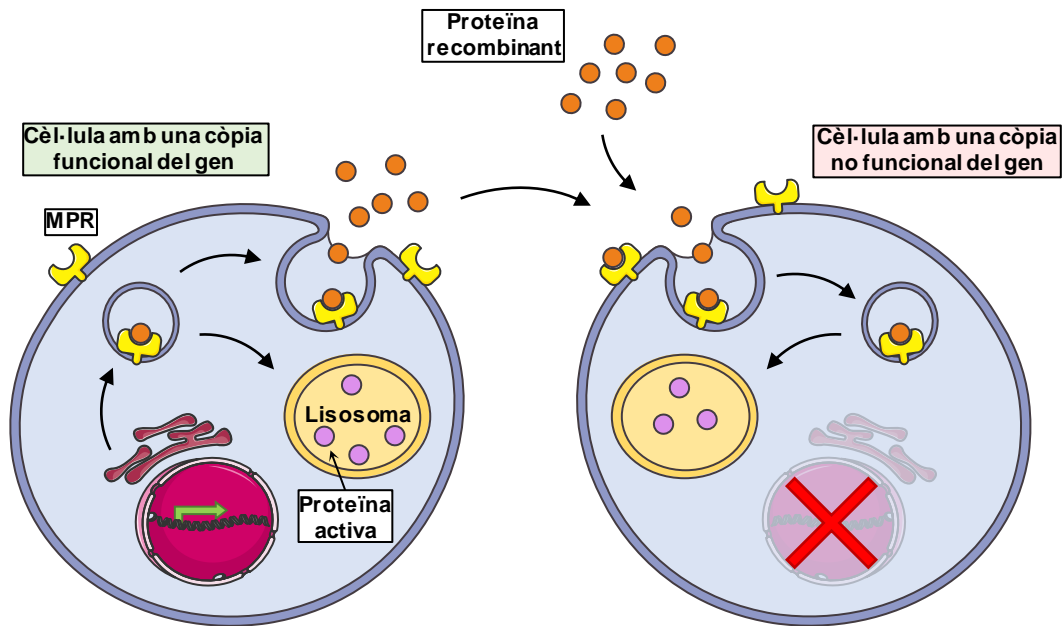
Les proteïnes lisosòmiques contenen un pèptid senyal d'uns 20 aminoàcids (aa) a la regió N-Terminal que dirigeix la translocació co-traducciona l al Reticle Endoplasmàtic (RE) (Figura 1) (*Braulke, 2009*). Al lumen del RE, les proteïnes poden rebre diverses modificacions post-traduccionals, com ara la proteòlisi de la senyal de direccionament al RE o la unió de l'oligosacàrid Glc<sub>3</sub>Man<sub>9</sub>GlcNac<sub>2</sub> a residus

d'Asparagina en seqüències N-X-S/T. La glicosilació és un procés indispensable pel correcte plegament, oligomerització i transport de la proteïna. Seguidament, les proteïnes arriben a l'Aparell de Golgi (AG) per transport vesicular. En aquest orgànu, les cadenes d'oligosacàrids es continuen modificant amb residus complexos, entre els quals destaca la fosforilació dels residus de mannososa per a generar la mannososa-6-fosfat (M6P) (Figura 1) (Braulke, 2009; Saftig, 2009). La M6P és un residu present en la majoria de proteïnes lisosòmiques solubles que actua com a lligant dels receptors de mannososa-6-fosfat (MPR) per a dirigir-les, principalment, al lisosoma. Ara bé, hi ha proteïnes lisosòmiques solubles que no estan modificades amb la M6P i utilitzen altres proteïnes lisosòmiques de membrana com a receptor per ser dirigides als lisosomes. Per exemple, la  $\beta$ -glucosidasa s'uneix a la proteïna lisosòmica integral de membrana 2 (LIMP2, *Lysosomal integral membrane protein 2*); i la prosaposina i la neurotensina, a la sortilina (Saftig, 2009). Tant els MPR com les proteïnes lisosòmiques de membrana contenen unes seqüències peptídiques a les cues citosòliques que els permet incorporar-se en vesícules de clatrina i sortir per transport vesicular del sistema trans-golgi (Figura 1) (Braulke, 2009; Luzio, 2014). Aquestes vesícules es fusionen amb els endosomes, uns orgànuls cel·lulars amb un pH àcid al voltant de 5.5, el qual permet la separació del receptor i la proteïna lisosòmica (Braulke, 2009). Els receptors són reciclats en vesícules i, majoritàriament, retornen a la xarxa trans-golgi per a repetir el mateix procés (Riederer, 1994). Ara bé, una part dels receptors migra fins a la membrana plasmàtica, on participa en l'exocitosi i endocitosi de proteïnes lisosòmiques del medi extracel·lular (Saftig, 2009). Els endosomes van madurant progressivament tot disminuint el seu pH fins que es fusionen amb els lisosomes. Al lisosoma, finalment, el pH més àcid dona lloc a la desfosforilació de la M6P i la maduració final de la proteïna, que habitualment inclou la proteòlisi per alguna de les hidrolases ja presents al lisosoma, així com la formació de complexos multienzimàtics (Figura 1) (Braulke, 2009; Makrypidi, 2012).



**Figura 1. Síntesi i transport intracel·lular de les proteïnes lisosòmiques.** Les proteïnes lisosòmiques se sintetitzen com a precursors al RE. Posteriorment es transporten fins a l'AG, on les proteïnes lisosòmiques solubles es modifiquen amb l'addició de la M6P. Aquesta modificació els permet unir-se al MPR i incorporar-se, juntament amb les proteïnes lisosòmiques de membrana, a les vesícules de clatrina que surten del sistema trans-Golgi i es fusionen amb els endosomes tardans. Aquí, el pH àcid permet la dissociació de les proteïnes solubles i el reciclatge dels MPR (fletxes taronges). Finalment, els endosomes tardans es fusionen amb els lisosomes, on es completa la maduració de les proteïnes lisosòmiques.

Cal tenir en compte que no totes les proteïnes lisosòmiques són dirigides al compartiment endo-lisosòmic. Una part de les vesícules que surten de la xarxa trans-golgi segueix la via clàssica de les proteïnes secretables i es fusiona directament amb la membrana plasmàtica (*Saftig, 2009*). D'aquesta manera, les proteïnes lisosòmiques solubles són excretades a l'espai extracel·lular. Com que les cèl·lules disposen de receptors MPR a la membrana plasmàtica, les proteïnes lisosòmiques poden retornar a l'interior de la cèl·lula i ser dirigides als lisosomes (*Parenti, 2015*). Aquest fenomen permet la correcció creuada (Figura 2), un mecanisme que exploten diversos protocols per al tractament de les LSD, com la substitució enzimàtica o la teràpia gènica, on fan arribar les proteïnes lisosòmiques funcionals a les cèl·lules deficientes (*Platt, 2009; Nagree, 2019*).



**Figura 2. Mecanisme de la correcció creuada.** Les proteïnes lisosòmiques solubles produïdes en una cèl·lula poden ser excretades al medi extracel·lular i al torrent sanguini. Les cèl·lules veïnes o distants que expressin els MPR a la seva membrana poden captar aquestes proteïnes exògenes i fer-les arribar al lisosoma. A alguns protocols per al tractament de les LSD, s'administra directament la proteïna recombinant o es modifica genèticament algunes cèl·lules per tal que la puguin produir i secretar. D'aquesta manera, s'aconsegueix que les cèl·lules que no poden sintetitzar la proteïna funcional la puguin captar del medi extracel·lular i recuperar-ne la funció.

## 1.2. Malalties d'acumulació lisosòmica

Les LSD són un conjunt d'unes 70 malalties monogèniques que afecten la funció catabòlica d'aquest orgànul (*Platt, 2018*). Són malalties d'herència autosòmica recessiva, excepte la síndrome de Hunter, la malaltia de Danon i la malaltia de Fabry que estan lligades al cromosoma X. Col·lectivament, presenten una incidència d'un de cada 5000-8000 naixements (*Parenti, 2015; Platt, 2018*). Les LSD estan provocades per mutacions als gens que codifiquen enzims, cofactors o transportadors lisosòmics. Com a conseqüència, els lisosomes no són capaços de degradar els substrats que arriben a aquest orgànul, on s'hi acumulen i provoquen la distensió lisosòmica (*Biffi, 2016*). Els lisosomes esdevenen disfuncionals, fet que interfereix en el funcionament correcte de les cèl·lules afectades i, finalment, en pot provocar la mort (*Platt, 2018*). Les LSD són un grup molt heterogeni de malalties que afecten diferents òrgans i teixits. En general, però, són malalties de caràcter progressiu que presenten visceromegàlies, poden afectar el sistema nerviós central (SNC) i resulten en una disminució significativa de l'esperança de vida dels pacients. Clínicament, s'acostumen a classificar segons el substrat acumulat (Taula 1) (*Parenti, 2015*).

Taula 1. Classificació de les LSD segons el tipus de substrat acumulat.

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

**Taula 1. Classificació de les LSD segons el tipus de substrat acumulat (continuació).**

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

MPS: mucopolisacariidosi; CLN: Lipofuscinosi ceroides neuronal. Adaptada de Wilcox, 2004; i Futerman, 2004.

## 2. NIEMANN-PICK TIPUS C2

A finals dels anys 20, a partir dels estudis desenvolupats pel pediatre Albert Niemann i el patòleg Ludwig Pick, es va començar a anomenar com a malaltia de Niemann-Pick tot un conjunt heterogeni de LSD d'herència autosòmica recessiva caracteritzades per l'acumulació d'esfingomielina i l'hepatosplenomegàlia, amb o sense afectació del SNC (*Vanier, 2010*). Més tard, l'any 1958, Crocker i Farber van proposar un sistema de classificació on la malaltia de Niemann-Pick es dividia en els tipus A, B, C i D (*Crocker, 1958*). El tipus A (NPA) presentava un deteriorament molt sever del SNC, amb una progressió molt ràpida a causa d'una elevada acumulació d'esfingomielina de forma generalitzada a tot l'organisme. El tipus B (NPB) era una malaltia crònica on només estaven afectats els teixits somàtics. En canvi, els tipus C (NPC) i D presentaven una afectació del SNC amb una progressió més lenta que el tipus A i una patologia somàtica menys severa que el tipus B (*Crocker, 1958*). Posteriorment, es va descriure l'error genètic causant dels diferents tipus de la malaltia de Niemann-Pick. Els tipus A i B estan causats per mutacions que afecten l'activitat de l'esfingomielinasa àcida, codificada al gen *SMPD1* (*Brady, 1966*). Tot i això, s'ha mantingut la denominació de tipus A i B a causa de la gran diferència clínica. Al tipus C, hi ha dues proteïnes causants de la malaltia que donen lloc a la denominació Niemann-Pick tipus C1 i C2 (*Steinberg, 1994*). El tipus C1 (NPC1) està ocasionat per mutacions al gen *NPC1* (*Carstea, 1997*), mentre que al tipus C2 (NPC2), al gen *NPC2* (inicialment anomenat *HE1*) (*Naureckiene, 2000*). El tipus D, classificat com a tal pel fet que els afectats eren tots d'ascendència dels Acadians de Nova Escòcia, és en realitat provocada per mutacions al gen *NPC1* i, per tant, actualment formen part del tipus C1 (*Vanier, 2003*). Les proteïnes NPC1 i NPC2 funcionen en tàndem a la sortida del colesterol no esterificat del compartiment endolisosòmic. Per tant, a diferència dels tipus A i B, el metabòlit d'acumulació primària a la malaltia de NPC no és l'esfingomielina, sinó el colesterol no esterificat. Clínicament, la malaltia de NPC1 i NPC2 són indistingibles (*Platt, 2018*).

### 2.1. Incidència de la NPC2

L'herència de la NPC és autosòmica recessiva i pan-ètnica (*Vanier, 2003*). Generalment, no es fa distinció entre la prevalença o la incidència de cada subtipus a causa de la similitud clínica entre ells. Tot i això, hi ha força consens que almenys el 95% dels casos de Niemann-Pick tipus C estan ocasionats per mutacions al gen *NPC1* i el percentatge restant al gen *NPC2* (*Vanier, 2003; Geberhiwot, 2018*). La incidència global de la NPC se situa en aproximadament 1 de cada 100.000 naixements vius

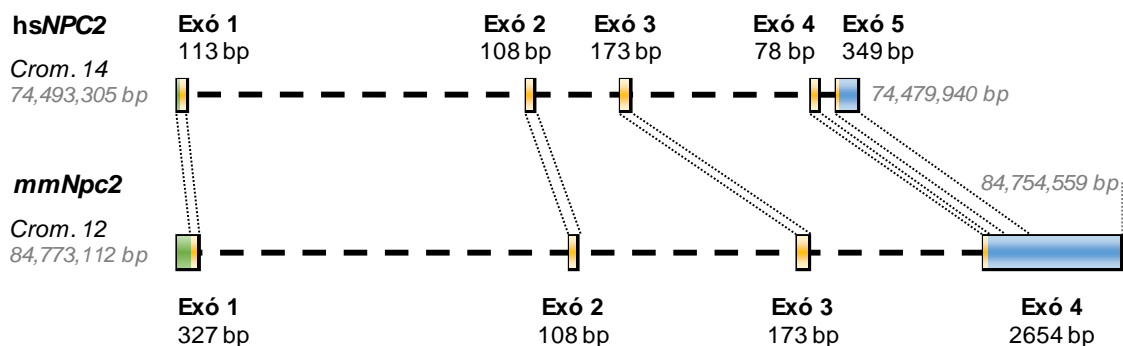


(Vanier, 2010; Jahnova, 2014; Geberhiwot, 2018). Així doncs, la incidència de la NPC2 és inferior a 1 de cada 2.000.000 naixements vius (Wassif, 2016). Aquesta dada es considera una subestimació, ja que l'ampli espectre fenotípic de la patologia, juntament amb la desinformació mèdica a causa de la condició de ser una malaltia minoritària, en pot dificultar el diagnòstic (Vanier, 2010). De fet, un estudi recent basat en dades obtingudes a partir de la seqüenciació de l'exoma suggereix que hi ha una prevalença tan alta com 1-2 de cada 40.000 persones (Wassif, 2016). Aquests resultats indiquen que hi ha un nombre molt elevat de pacients amb formes no clàssiques de la NPC o bé no diagnosticats correctament (Wassif, 2016). No s'han fet estudis en profunditat, però la majoria de pacients de NPC2 descrits provenen del nord d'Àfrica, Turquia i Itàlia (Geberhiwot, 2018; Xu, 2019).

## 2.2. Característiques moleculars de la NPC2

### 2.2.1. Gen NPC2

Als humans, el locus del gen *NPC2* (Gene ID: 10577), que anteriorment rebia el nom d'*HE1*, es localitza al cromosoma 14q24.3, té una llargada de 13366 bp i conté 5 exons (Figura 3) (Naureckiene, 2000; Millat, 2005; Xu, 2019). L'expressió del gen *NPC2* és ubiqua i genera un transcrit d'aproximadament 1 kb. Els nivells més alts d'expressió es localitzen als testicles, als ronyons i al fetge, seguit d'uns nivells considerablement més baixos al múscul i al pulmó (Kirchhoff, 1996; Naureckiene, 2000). En ratolins, el gen *Npc2* (Gene ID: 67963) té el seu locus al cromosoma 12 (37.39 cM), és més llarg que el gen humà, amb una longitud de 18554 bp, i únicament conté 4 exons (Figura 3). L'exó 4 del gen murí té una homologia molt alta amb els exons 4 i 5 del gen humà.



**Figura 3. Esquema dels gens codificants de la NPC2 humana i de ratolí.** Esquema a escala de la mida, l'organització i la localització cromosòmica del gen *NPC2* (*hsNPC2*, d'origen humà) i *Npc2* (*mmNpc2*, d'origen murí). Les caixes indiquen els exons i la línia discontinua horitzontal, els introns. Les línies discontinues obliqües indiquen l'homologia entre els exons. La part codificant del gen s'indica en color groc, la regió 5'-UTR (*untranslated region*, regió no traduïda), de color verd i la 3'-UTR, en blau.

### 2.2.2. Proteïna NPC2

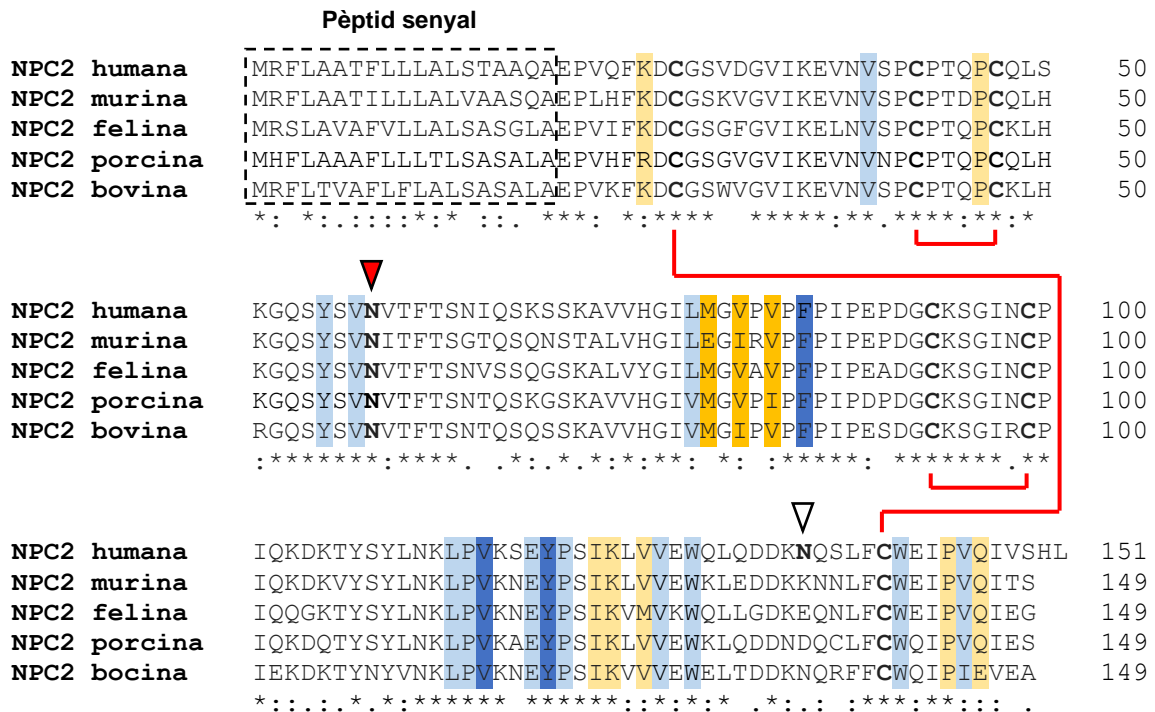
La NPC2 és una proteïna lisosòmica soluble de 16 kDa que s'uneix al colesterol no esterificat (McCauliff, 2015). La NPC2 se sintetitza com una glicoproteïna de 151 aa que conté una seqüència senyal de 19 aa, la qual es talla per a donar una proteïna madura de 132 aa (Figura 4) (Kirchhoff, 1996; Naureckiene, 2000). Té una estructura terciària de tipus *immunoglobulin-like*, estabilitzada per 3 ponts disulfur entre les cisteïnes 27-140, 42-47 i 93-99 (Friedland, 2003) (Figura 4). El nucli hidrofòbic de la NPC2 conté una cavitat per a la unió del colesterol formada pels residus F85, V115, Y119, indispensables per la interacció amb el colesterol, així com els residus V39, Y55, V57, L78, V83, L113, P114, E118, P120, V126, W128, W141 i V145 (Friedland, 2003; Xu, 2007; Wang, 2010). La NPC2 està N-glicosilada a la posició Asn-58 amb l'oligosacàrid M6P, necessari per tal de dirigir-la al lisosoma (Chikh, 2004). Addicionalment, hi ha dos altres llocs potencials de glicosilació (N-X-S/T), l'N38 i l'N135 (Friedland, 2003). Només hi ha evidències de la glicosilació ocasional de l'N135, una asparagina no conservada entre espècies, que en estudis *in vitro* condueix a una reducció de la capacitat de la proteïna NPC2 per transferir el colesterol entre membranes (Chikh, 2004; Cheruku, 2006).

La NPC2 és una proteïna altament conservada entre mamífers (Friedland, 2003). Concretament, la identitat de la seqüència peptídica de la NPC2 humana i murina és del 80.1% i tenen una similitud del 87.4% (Figura 4).

La funció exacta de la proteïna NPC2 encara és força desconeguda. Se sap que és una proteïna d'unió al colesterol i que participa en la seva sortida del compartiment endo-lisosòmic, però no es descarta que també participi en la sortida d'altres lípids (Walkley, 2004; Xu, 2008; Lloyd-Evans, 2010). El model més acceptat és que la NPC2 s'uneix i extreu el colesterol de les membranes internes del lisosoma, s'uneix al domini luminal de la proteïna NPC1 i el transfereix al domini N-terminal d'aquesta proteïna. Els residus M79, V81 i V83 són indispensables per a la transferència del colesterol a la proteïna NPC1 (Figura 4) (Xu, 2007; Wang, 2010; Li, 2016b). Posteriorment, el colesterol es transfereix des de la NPC1 a la membrana externa del lisosoma, des d'on es transporta a altres compartiments cel·lulars (Kwon, 2009).

A part d'intervenir en el transport de lípids, es creu que la NPC2 pot tenir altres funcions. Alguns estudis la proposen com a receptor de reconeixement de patrons de la immunitat innata, ja que es pot unir als lipopolisacàrids o al lípid A (Shi, 2012; Platt, 2016). Per altra banda, també és una proteïna molt abundant en diverses secrecions

humanes, com ara la llet materna, el plasma, el semen o la bilis, fet que suggereix possibles funcions extracel·lulars encara no descrites (Appelqvist, 2013).



**Figura 4. Alineació de la seqüència proteica de la NPC2 humana, murina, felina, porcina i bovina.** La seqüència senyal està marcada amb la caixa de línia discontinua; els aa indispensables per a la unió del colesterol estan marcats de color blau fosc; els aa que formen la cavitat d'unió al colesterol, en blau clar; els aa indispensables per a la transferència del colesterol a la NPC1, en groc fosc; els aa que participen en la unió a la NPC1, en groc clar; el punt de glicosilació conservat està marcat amb una punta de fletxa vermella, mentre que el punt de glicosilació addicional en humans correspon a la punta de fletxa blanca; els ponts disulfur s'indiquen amb les línies vermelles. \* aa idèntics, : aa amb característiques químiques similars; . aa amb una mida o estructura similar.

### 2.2.3. Mutacions al gen NPC2

Actualment, es coneixen 25 mutacions causants de la malaltia de NPC2, segons les dades extretes de la *Human Gene Mutation Database* (HGMD) durant l'agost de 2020 (Taula 2). El tipus de mutació més freqüent és la de tipus *missense* (sentit erroni), que corresponen a un 45% dels al·lels identificats. Un 26% de les mutacions corresponen a les mutacions *nonsense* (sense sentit), un 15% són mutacions que afecten l'*splicing* (empalmament) i un 11% són petites delecions que generen mutacions del tipus *frameshift* (canvis del marc obert de lectura). Finalment, també s'ha identificat un al·lel amb una gran delecio entre l'exó 2 i 3 que impedeix la síntesi de la NPC2 (Wassif, 2016; Xu, 2019).

Taula 2. Descripció dels al·lels mutants identificats als pacients de NPC2.

Mutació del gen	Mutació de la proteïna	Localització	Tipus de mutació	Referència
c.1A>T	p.M1L	Exó 1	Missense	(Fancello, 2009)
c.3G>C	p.M1I	Exó 1	Missense	(Zhang, 2014)
c.27delG	p.L9fs	Exó 1	Frameshift	(Park, 2003; Xu, 2019)
c.58G>T	p.E20X	Exó 1	Nonsense	(Naureckiene, 2000; Verot, 2007; Fancello, 2009)
c.82+2T>C	IVS1+2T>C	Intró 1	Splicing	(Verot, 2007)
c.88G>A	p.V30M	Exó 2	Missense	(Cupidi, 2016; Wassif, 2016)
c.115G>A	p.V39M	Exó 2	Missense	(Klünemann, 2002; Chikh, 2005; Verot, 2007)
c.133C>T	p.Q45X	Exó 2	Nonsense	(Verot, 2007)
c.140G>T	p.C47F	Exó 2	Missense	(Chikh, 2005)
c.141C>A	p.C47X	Exó 2	Nonsense	(Chikh, 2005)
c.165C>G	p.Y55X	Exó 2	Nonsense	(Verot, 2007)
c.190+5G>A	IVS2+5G>A	Intró 2	Splicing	(Millat, 2001; Xu, 2019)
c.199T>C	p.S67P	Exó 3	Missense	(Chikh, 2005)
c.278G>T	p.C93F	Exó 3	Missense	(Chikh, 2005)
c.295T>C	p.C99R	Exó 3	Missense	(Chikh, 2005)
c.332delA	p.N111fs	Exó 3	Frameshift	(Naureckiene, 2000)
c.333T>G	p.N111K	Exó 3	Missense	(Runz, 2008)
c.352G>T	p.E118X	Exó 3	Nonsense	(Reunert, 2015; Xu, 2019)
c.358C>T	p.P120S	Exó 3	Missense	(Verot, 2007)
c.363+6T>G	IVS3+6T>G	Intró 3	Splicing	(Reunert, 2015)
c.408-409delAA	p.Q136fs	Exó 4	Frameshift	(Griese, 2010)
c.434T>A	p.V145E	Exó 4	Missense	(Yaman, 2015)
c.436C>T	p.Q146X	Exó 4	Nonsense	(Millat, 2005; Verot, 2007)
c.441+1G>A	IVS4+6T>G	Intró 4	Splicing	(Cupidi, 2016; Wassif, 2016)
?	-	Exó 2-3	Gran deleció	-

Adaptat de la base de dades *Human Gene Mutation Database* (HGMD), de Wassif (2016) i de Xu (2019).

A causa de la baixa incidència de la NPC2, així com el fet que molts pacients presenten mutacions úniques, hi ha molt pocs estudis de la freqüència de les mutacions. La més ben estudiada és la mutació c.58G>T (p.E20X), que s'ha detectat al 35% dels pacients de NPC2 i s'ha observat en 24 famílies no relacionades a tot el món (Millat, 2001; Vanier, 2010; Sheth, 2017). Comparativament, la freqüència d'aquest al·lel a la població italiana és superior a la proporció mundial, ja que es va detectar a 6 famílies d'aquest país (Fancello, 2009). Per altra banda, a un estudi de seqüenciació massiva de la població, es va observar un estatus de portador del 0.118% de qualsevol dels al·lels patogènics enumerats anteriorment, dels quals les 3 mutacions més freqüents van ser la p.E20X, la p.v39M i la p.C93F (Wassif, 2016).

#### **2.2.4. Correlació genotip-fenotip**

Establir una correlació genotip-fenotip a la malaltia de NPC2 és bastant difícil, perquè hi ha pocs pacients i habitualment no comparteixen la mateixa mutació (Verot, 2007). En general, es pot afirmar que les mutacions que generen versions truncades de la proteïna, com les *nonsense*, les grans delecions o les petites delecions que provoquen un *frameshift*, estan associades als fenotips més severos de la malaltia (Vanier, 2010; Xu, 2019). La mutació p.E20X, per exemple, només permet la síntesi del pèptid senyal i, quan es troba en homozigosi, produeix el fenotip neonatal i infantil precoç amb una afectació greu del sistema respiratori i icterícia colestàsica (Millat, 2001; Verot, 2007; Bonney, 2010; Sheth, 2017). Altres mutacions que s'han identificat en pacients amb aquest fenotip són: IVS1+2T>C, p.Q45X, p.C47X, p.Y55X i p.Q146X (Chikh, 2005; Millat, 2005; Verot, 2007). En canvi, l'impacte de les mutacions *missense* és molt més divers. Els pacients amb les mutacions que afecten la síntesi de la proteïna (com la p.M1L o la p.M1I) o la seva estructura terciària (com la p.C93F o la p.C99R, que intervenen en la formació dels ponts disulfur) donen lloc a les formes neonatals i infantils (Chikh, 2005; Fancello, 2009). Per altra banda, s'han identificat altres mutacions *missense* associades amb les formes que presenten una afectació principalment neurològica i de progressió més lenta de la malaltia, com la p.P120S (juvenil) i la p.V39M (adulta) (Klünemann, 2002; Millat, 2005).

### **2.3. Metabolisme del colesterol**

#### **2.3.1. Estructura i funció del colesterol**

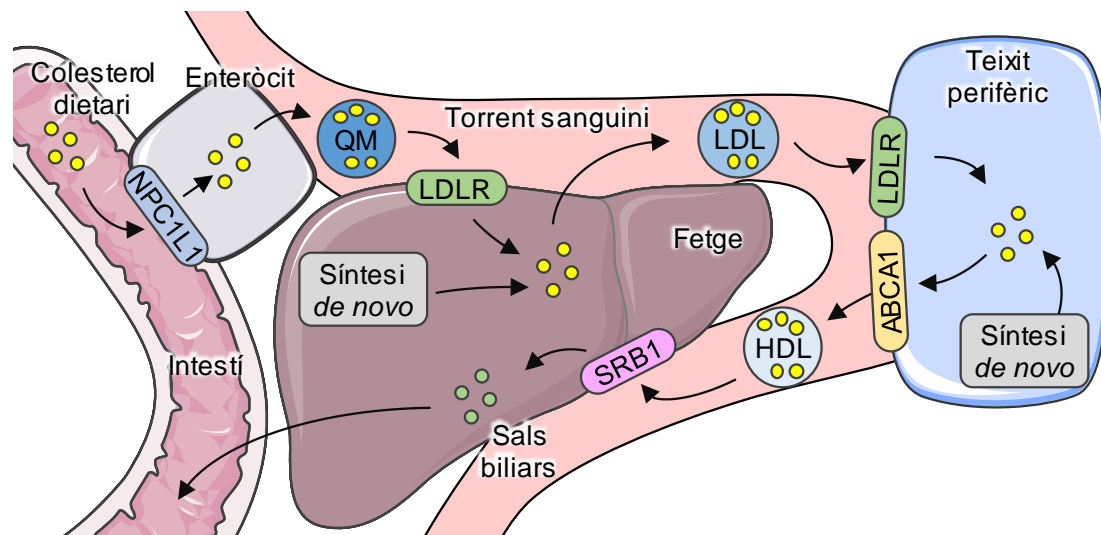
El colesterol és un lípid de tipus esteroide que consta de 4 anells hidrocarbonats. A més a més, conté un grup hidroxil i una cua alifàtica. Així doncs, és una molècula altament hidrofòbica que necessita ser incorporada a les lipoproteïnes pel seu transport dintre de l'organisme. Les principals són els quilomicrons, les lipoproteïnes de baixa densitat (LDL, *low density lipoprotein*) i les lipoproteïnes d'alta densitat (HDL, *high density lipoprotein*) (Ikonen, 2008).

El colesterol és un metabòlit amb funcions molt diverses i importants, tant a l'organisme com a les cèl·lules. És un component de la membrana plasmàtica (30-45% dels lípids totals), on hi regula la fluïdesa, la permeabilitat, els fenòmens de transport entre membranes o la transducció de senyals, especialment a les sinapsis neuronals (Soccio, 2004; Petrov, 2016). A més a més, és un precursor de les hormones esteroides, de les sals biliars i de la vitamina D. També juga un paper clau al desenvolupament

embrionari, ja que modula la senyalització de la proteïna *Sonic hedgehog* (Ikonen, 2008; Hegele, 2009; Luo, 2020).

### 2.3.2. Fonts de colesterol i vies de transport a l'organisme

L'organisme disposa de dues fonts de colesterol: el dietari i el produït endògenament, que suposen, respectivament, un 30% i un 70% del total del colesterol (Ikonen, 2008; Hegele, 2009). Els esterols de la dieta s'absorbeixen a l'intestí a través del transportador NPC1L1 (*Niemann-Pick C1-Like 1*) dels enteròcits i s'incorporen als quilomicrons (Figura 5). Els quilomicrons, que primerament són secretats a la limfa i d'aquí passen al torrent sanguini, arriben i s'internalitzen al fetge mitjançant el receptor del LDL (LDLR). Posteriorment, el fetge és l'òrgan encarregat de distribuir el colesterol a la resta de teixits mitjançant les partícules de LDL (Hegele, 2009). Quan els teixits perifèrics tenen un excés de colesterol, el carreguen a les partícules HDL formades per l'apolipoproteïna A1 (apoA1) mitjançant el transportador dependent d'ATP ABCA1. Aquest procés rep el nom de transport revers del colesterol (Ikonen, 2008). Al fetge i als teixits esteroïdogenics, com les glàndules adrenals, el receptor SRB1 (*Scavenger receptor B1*) internalitza les partícules d'HDL. Finalment, l'excés de colesterol s'elimina de l'organisme en forma de sals biliars (Patel, 2008).



**Figura 5. Transport i distribució del colesterol als òrgans perifèrics.** El colesterol dietari s'absorbeix a través del transportador NPC1L1 als enteròcits de l'intestí. Posteriorment, s'incorpora als quilomicrons (QM) i s'internalitza al fetge a través del receptor LDLR. Al fetge, el colesterol dietari juntament amb el sintetitzat *de novo* es distribueix a la resta de teixits mitjançant les partícules de LDL. Els teixits perifèrics excreten l'excés de colesterol a través de partícules d'HDL, carregades amb el transportador ABCA1. L'HDL s'internalitza al fetge a través del receptor SRB1, on el colesterol es converteix en sals biliars i s'excreta fora de l'organisme.

Tot i que el fetge és el principal sintetitzador de colesterol a l'organisme (Luo, 2020), totes les cèl·lules nucleades de l'organisme tenen la capacitat de sintetitzar-lo *de novo* per la via del mevalonat a partir de l'acetat, quan els nivells circulants no són suficients (Platt, 2014). La síntesi *de novo* és una via complexa que inclou nombrosos passos i està compartimentalitzada en diferents orgànuls, incloent els mitocondris, els peroxisomes, el RE i el citoplasma (Sharpe, 2013; Faust, 2014). El primer pas d'aquesta via metabòlica consisteix en la polimerització i la reducció de diverses molècules d'acetat a través de 3 reaccions enzimàtiques per a generar el 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA) (Nes, 2011). La síntesi del mevalonat a partir de l'HMG-CoA està catalitzada per l'HMG-CoA reductasa (HMGCR), que és l'enzim limitant de la producció del colesterol (Soccio, 2004). El mevalonat es modifica a través de 7 reaccions enzimàtiques per a donar lloc al lanosterol, el primer metabòlit de la via classificat com a esterol. Després de múltiples reaccions seqüencials, el lanosterol es transforma en colesterol mitjançant la via de Bloch o la via de Kandutsch-Russel. Tot i que ambdues vies comparteixen els mateixos enzims, es diferencien en el moment en el qual es redueix el doble enllaç del C24. Cada tipus cel·lular utilitza preferencialment una via o l'altra (Faust, 2014; Mitsche, 2015).

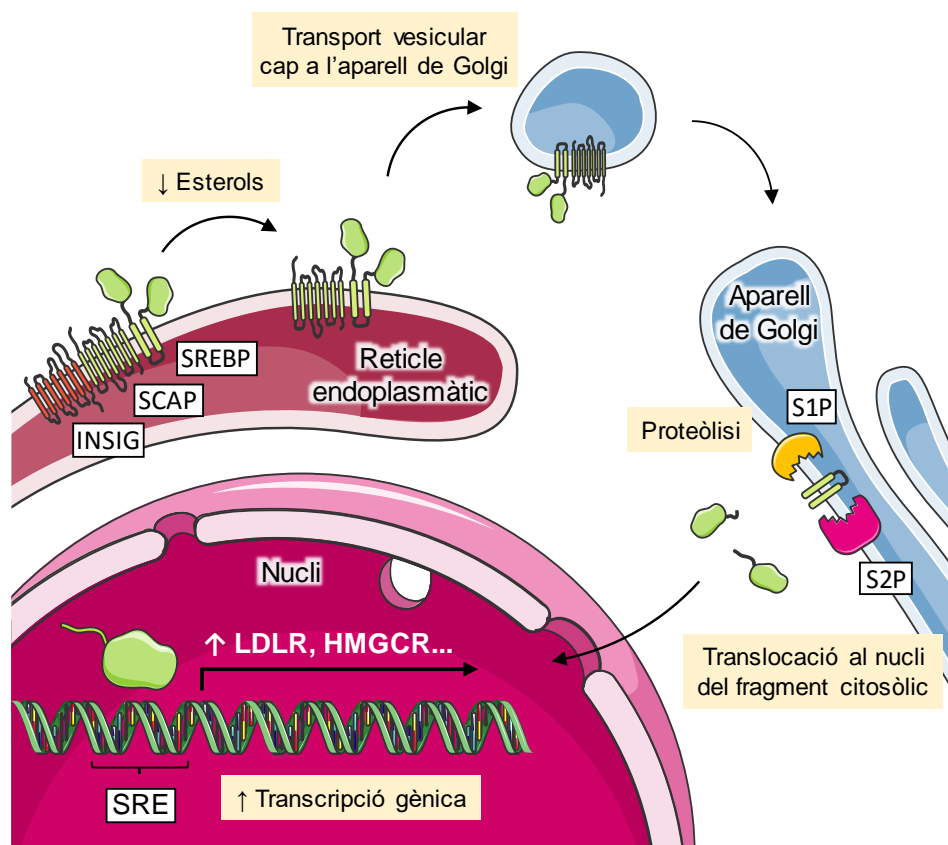
#### 2.3.2.1. Mecanismes de regulació transcripcional del colesterol

Les cèl·lules disposen de dos grups de receptors nuclears que s'encarreguen de regular els nivells de colesterol intracel·lulars: les proteïnes d'unió a l'element regulador dels esterols (SREBP, *Sterol Regulatory Element Binding Protein*) i els receptors hepàtics X (LXR, *Liver X receptor*) (Ikonen, 2008).

Les SREBP activen la síntesi dels gens que incrementen la concentració de colesterol (Sharpe, 2013). Aquests factors de transcripció es troben en un complex amb la proteïna activadora per tall de les SREBP (SCAP, *SREBP Cleavage-Activating Protein*) i la proteïna del gen induït per insulina 1 (*Insulin-Induced Gene 1 protein*, INSIG), que contenen els anomenats dominis sensor d'esterols (SSD, *sterol sensing domain*) (Figura 6). Quan la concentració de colesterol i de 25-hidroxicolesterol són elevats i s'uneixen als SSD de les proteïnes SCAP i INSIG, aquest complex es troba retint al RE. En canvi, quan disminueixen els nivells d'esterols, la INSIG es dissocia del complex SCAP-SREBP. Aquesta dissociació provoca un canvi conformacional de la proteïna SCAP que li permet interaccionar amb les vesícules de COP-II. D'aquesta manera, la SCAP i la SREBP arriben per transport vesicular a l'AG. En aquest compartiment, les proteases S1P (*Site-1 protease*) i S2P (*Site-2 protease*) alliberen el

fragment citosòlic de les SREBPs, que es transloca al nucli (*Ikonen, 2008; Faust, 2014*) (Figura 6). Un cop al nucli, s'uneix a les seqüències de l'element regulador dels esterols (de l'anglès *Sterol Regulatory Element*, SRE) dels promotors de diversos gens involucrats en la síntesi *de novo* de colesterol, com ara l'HMGCR o l'HMG-CoA sintasa, o en la seva captació des del medi extracel·lular, per exemple l'LDLR (*Madison, 2016*) (Figura 6).

Per tal de poder controlar finament el sistema de les SREBP-INSIG-SCAP, el RE conté habitualment una concentració relativament baixa de colesterol, només entre un 0.5 i un 1% del colesterol total de la cèl·lula. Un dels mecanismes que utilitza la cèl·lula per a disminuir la quantitat de colesterol al RE és mitjançant la seva esterificació. La proteïna esterol O-aciltransferasa, que es troba al RE, participa en la formació de les gotes lipídiques a través de l'esterificació del colesterol amb els àcids grassos. Aquesta reserva de colesterol es considera metabòlicament inactiva. (*Ikonen, 2008*).



**Figura 6. Regulació transcripcional de la síntesi de colesterol.** El factor de transcripció SREBP es troba retingut al RE formant un complex amb les proteïnes INSIG i SCAP quan els nivells d'esterols són elevats. Quan hi ha una reducció d'esterols, la proteïna INSIG es dissocia i el complex SCAP-SREBP es transporta fins a l'AG. L'acció conjunta de les proteases S1P i S2P dona lloc a l'alliberació del fragment citosòlic de la SREBP. Aquest fragment citosòlic es transloca al nucli i activa la transcripció de gens implicats en l'augment dels nivells intracel·lulars del colesterol mitjançant la unió a la seqüència SRE dels promotors.



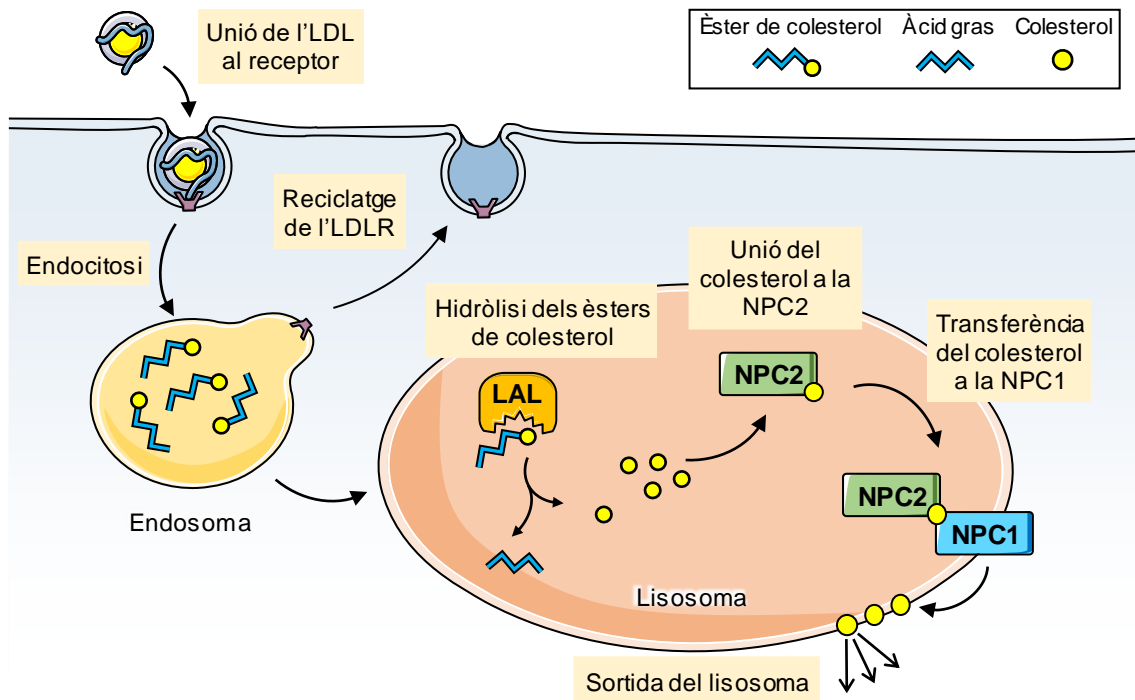
Per altra banda, els LXR responen als nivells d'oxiesterol, unes formes oxidades derivades del colesterol. Quan els nivells de colesterol són elevats, també ho són els oxiesterol (*Ikonen, 2008; Faust, 2014*). Quan la concentració d'oxiesterol és baixa, els LXR actuen com a repressor transcripcional mitjançant la unió a les seqüències d'unió de l'LXR (LXRE, *LXR-responsive element*). En canvi, quan augmenten els nivells d'esterol i aquests s'uneixen als LXR, es redueix l'afinitat dels LXR pels LXRE i s'activa la transcripció dels gens implicats en la reducció dels nivells de colesterol (*Patel, 2008*). Els gens que contenen un LXRE participen en el transport revers del colesterol des dels teixits perifèrics cap al fetge, com ara els transportadors dependents d'ATP ABCA1 o l'ABCG1, així com en la producció de sals biliar per a excretar-lo fora de l'organisme, com el Citocrom P450 7A1 (CYP7A1) (*Patel, 2008*).

### **2.3.3. Transport del colesterol al compartiment endo-lisosòmic**

Tant el colesterol dietari com el produït al fetge es transporta per la sang a través de les partícules de LDL, gran part del qual està esterificat per acció de la proteïna transferidora d'èsters de colesterol (CETP) (*Hegele, 2009*). Els teixits perifèrics, inclòs el fetge, disposen de receptors LDLR a la membrana plasmàtica, una via complementària a la síntesi *de novo* per tal de satisfer les seves necessitats de colesterol. Quan les partícules de LDL interaccionen amb els LDLR o les proteïnes relacionades amb els LDLR (LRP, *LDLR-related protein*), s'internalitzen per endocitosi mitjançant les vesícules de clatrina i es fusionen amb els endosomes primerencs (Figura 7). Aquí, es reciclen els LDLR cap a la membrana plasmàtica. Els endosomes primerencs s'acidifiquen i esdevenen endosomes tardans que, posteriorment, es fusionen amb els lisosomes (*Ikonen, 2008; Meng, 2020*). En primer lloc, cal l'acció de la Lipasa Àcida Lisosòmica (LAL) per a hidrolitzar els èsters de colesterol i generar el colesterol lliure (*Du, 2001; Huang, 2014*). Com que el colesterol és molt hidrofòbic, queda unit a les membranes internes del lisosoma, generades per l'endocitosi de les LDL o per la unió del lisosoma als fagosomes (*Meng, 2020*).

Ara bé, la sortida del colesterol no esterificat del lisosoma és encara un procés poc caracteritzat. La teoria més acceptada és que la proteïna NPC2 inicia el procés extraient el colesterol de les membranes internes del lisosoma i el transfereix a la proteïna NPC1, situada a la membrana limitant del lisosoma (*Cheruku, 2006; Xu, 2007; Kwon, 2009; Storch, 2009*). Altres estudis proposen vies complementàries que involucren la transferència del colesterol des de la NPC2 cap a la proteïna lisosòmica associada a la membrana 2 (LAMP2, *Lysosomal Associated Membrane Protein 2*) o la

LIMP2 (Li, 2016a; Heybrock, 2019). Tot i això, aquestes vies complementàries han mostrat velocitats de transferència substancialment inferiors a les de la interacció NPC2-NPC1. Finalment, el colesterol es transfereix des de la membrana externa del lisosoma fins als altres compartiments cel·lulars ja sigui per transport vesicular com no vesicular (Soccio, 2004; Ikonen, 2008; Luo, 2017) (Figura 7).



**Figura 7. Transport del colesterol al compartiment endo-lisosòmic.** El colèsterol es transporta en forma d'èsters de colesterol en partícules de LDL. Quan les partícules de LDL interaccionen amb el LDLR, s'internalitzen per endocitosi fins als endosomes i d'aquí als lisosomes. Els receptors es reciclen i retornen a la membrana plasmàtica. Els èsters de colesterol s'hidrolitzen per acció de la LAL i el colesterol queda unit a les membranes internes del lisosoma. La NPC2 s'encarrega d'extreure el colesterol i transferir-lo a la proteïna NPC1 a la membrana limitant del lisosoma. Un cop a la membrana limitant, el colesterol es transporta cap a altres compartiments cel·lulars.

#### 2.3.4. Metabolisme del colesterol al SNC

El metabolisme del colesterol al SNC presenta unes diferències notables amb el que s'observa als teixits perifèrics. La primera és que el colesterol dietari o el produït en òrgans perifèrics no pot creuar la barrera hematoencefàlica (BHE). Així doncs, pràcticament tot el colesterol del SNC se sintetitza *in situ*, principalment a les cèl·lules de la glia (Orth, 2012). La segona és que el cervell té una concentració molt superior de colesterol que la resta de l'organisme, que se situa al voltant de 15-30 mg/g de teixit comparat amb els 2-3 mg/g dels teixits perifèrics. De fet, el SNC conté aproximadament

el 25% del colesterol total de l'organisme. Finalment, els èsters de colesterol tenen un paper poc rellevant al SNC, ja que només suposen l'1% del colesterol total, que està localitzat en gotes lipídiques intracel·lulars (*Petrov, 2016*).

Al SNC, trobem dues reserves de colesterol força diferenciades. Per una banda, hi ha el colesterol que forma part de les membranes plasmàtiques de les neurones (10% del total) i de les cèl·lules de la glia (20% del total). Aquest colesterol es renova relativament ràpid, amb una vida mitjana de 5-10 mesos, i equival a 8 mg/g de teixit. Per altra banda, la majoria del colesterol (un 70%) forma part de les beines de mielina (40 mg/g de teixit). En aquest cas, es tracta d'una reserva que es renova molt lentament amb una vida mitjana de 5 anys (*Dietschy, 2009*).

Els humans naixem amb una quantitat molt baixa de mielina. Durant els primers 3 mesos de vida, la producció de colesterol al SNC és molt elevada per tal d'assolir els nivells de síntesi de mielina necessaris. En aquest interval, els oligodendròcits i les neurones són els que sintetitzen el colesterol (*James A. Bourne, 2006; Williamson, 2018*). En canvi, aquesta síntesi decreix un 90% quan el cervell ja és madur i, a partir d'aquest moment, la producció es limita fonamentalment als astròcits. Les neurones segueixen mantenint certa activitat, però aquesta és totalment insuficient per cobrir les necessitats neuronals i l'aportació extracel·lular per part dels astròcits és totalment indispensable (*Petrov, 2016*).

La síntesi *de novo* dels astròcits es fa principalment per la via de Bloch (desmosterol) i a les neurones per la via de Kandutsch-Russel (*Petrov, 2016*). Per tal de nodrir les neurones, els astròcits utilitzen les partícules d'apolipoproteïna E (apoE) que es carreguen amb colesterol mitjançant els transportadors de tipus ABC (ABCA1, ABCG1 i ABCG4) (*Lane-Donovan, 2014*). Les neurones capten les partícules d'ApoE mitjançant els LDLR de la membrana plasmàtica, que s'internalitzen per endocitosi i es fusionen amb els endosomes tardans o els lisosomes. El colesterol, que arriba en forma no esterificada, abandona el lisosoma gràcies a l'acció en tàndem de la NPC2 i la NPC1. Seguidament, el colesterol arriba al RE, que el distribueix als compartiments cel·lulars que siguin necessaris i, a més a més, en regula la seva síntesi *de novo* per retroalimentació negativa (*Zhang, 2015*).

De la mateixa manera que la BHE impedeix l'entrada de colesterol al SNC, també en bloqueja la sortida. Però, tot i això, cada dia n'excreta entre 6 i 12 mg de dues maneres diferents. Una opció és en forma de 24-hidroxicolesterol (24-HC), un oxiesterol generat per l'enzim CYP46A1 a les neurones. El 24-HC difon per la BHE a un ritme de 6-8 mg/dia, entra a la circulació sanguínia i s'uneix a les partícules de LDL.

Posteriorment, els oxisterols es metabolitzen al fetge i s'excreten en forma de sals biliars (Zhang, 2015; Petrov, 2016). L'altra opció és en forma de partícules ApoE/ApoA carregades de colesterol utilitzant el transportador ABCA1, que s'activa a les neurones i astròcits perivasculars quan els nivells de colesterol són excessius. Les partícules d'ApoE/ApoA es poden translocar a través de la BHE i arribar al fetge, on seran excretades de forma similar al oxisterols (Orth, 2012).

#### 2.4. Acumulació de lípids a la NPC2

Tot i que la funció exacta de les proteïnes NPC1 i NPC2 no està totalment definida, sí que es pot afirmar que participen en el transport i la sortida del colesterol no esterificat des del compartiment endo-lisosòmic cap als altres compartiments cel·lulars (Storch, 2009; Meng, 2020). Així doncs, es considera que el colesterol és el metabòlit d'acumulació primària als lisosomes a la malaltia de NPC (Walkley, 2009). Tot i que a les biòpsies i les mostres hepàtiques *post mortem* de pacients humans s'ha descrit un increment del contingut total de colesterol al fetge de 2-3 vegades respecte la població sana, que en models animals és encara més elevat (Lloyd-Evans, 2010), no s'observa una variació clara del contingut de colesterol total al SNC. El defecte del transport del colesterol al compartiment endo-lisosòmic de les neurones únicament provoca la seva deslocalització, de manera que queda retingut al soma neuronal i està disminuït als axons i, per tant, la seva quantitat total es manté estable. Al SNC, com que el colesterol està en grans quantitats a les beines de mielina, s'ha observat una disminució del contingut de colesterol no esterificat a la matèria blanca dels models animals de la NPC1 i també als pacients humans (Vanier, 1999; Totenhagen, 2012). A part del colesterol, s'observa l'acumulació secundària d'altres lípids:

- *El bis(monoacilglicero)fosfat (BMP)*: és un lípid que es troba en grans quantitats a les membranes internes dels lisosomes i endosomes i interacciona amb la NPC2 per tal de facilitar el transport del colesterol (Chevallier, 2008; Storch, 2009; Mccauliff, 2019). El BMP s'acumula principalment al fetge i a la melsa dels pacients (Walkley, 2009).
- *Les bases esfingoides lliures*: són els precursors de la síntesi d'esfingolípid i en condicions normals es troben en concentracions ínfimes. En canvi, aquests compostos es troben altament incrementats al fetge i la melsa de pacients humans, entre 20 i 50 vegades per sobre dels valors de la població sana (Newton, 2018). Comparativament, l'augment al cervell és més modest, al voltant de 3 a 5 vegades més (Newton, 2018). L'acumulació de bases esfingoides lliures

i els seus derivats, com els lisoesfingolípid, té efectes citotòxics i incrementa l'acumulació de l'esfingomielina (*Davidson, 2009; Sitarska, 2019; Breiden, 2020*).

- *L'esfingomielina*: és un lípid molt afí al colesterol, amb el qual es creu que forma complexos. El metabolisme d'ambdós lípids està coordinat i s'ha observat que el nivell de colesterol regula el trànsit de l'esfingomielina a la via endocítica (*Puri, 1999*). No és estrany, doncs, que l'acumulació d'esfingomielina als pacients de NPC segueixi el mateix patró que el del colesterol: s'acumula especialment a la melsa, presenta uns valors més moderats al fetge i es troba inalterat a l'encèfal (*Vanier, 1983, 1999*). Als models animals de la NPC1 i NPC2, en canvi, l'esfingomielina s'acumula principalment al fetge, enlloc de la melsa (*Sleat, 2004; Fan, 2013*).
- *Els glicoesfingolípid*: el GM2 i GM3 són uns glicoesfingolípid que constitueixen només entre un 1 i un 2% dels gangliòsids totals del cervell humà. En canvi, els pacients de NPC presenten un increment d'aquests dos gangliòsids, especialment el del GM2, acompanyats d'una acumulació de lactosilceramida i glucosilceramida (*Vanier, 1999*). Tot i que l'acumulació de gangliòsids estigui absent en estadis fetals, s'inicia poc després del naixement (*Walkley, 2009*). Alguns estudis immunohistoquímics han demostrat que el GM2 i el GM3 es concentren principalment en vesícules perinuclears que no co-localitzen amb les vesícules de colesterol (*Zervas, 2001b; Zhou, 2011*). L'increment de glicoesfingolípid també s'ha observat tant al fetge de pacients humans, com també als models felins i murins de la patologia (*Walkley, 2009*).

## 2.5. Fisiopatologia de la NPC2

Com a la resta de LSD, els processos que intervenen en la fisiopatologia de la malaltia de NPC són complexos i no estan suficientment caracteritzats. En general, la majoria d'estudis es centren en els processos patogènics al SNC a causa de la major incidència i severitat d'aquest símptomes. Com que el tipus C1 és més prevalent que el tipus C2, la majoria d'estudis s'han realitzat amb pacients o models animals de la NPC1, però apliquen a ambdós tipus ja que són clínicament indistingibles a causa de l'acció en tàndem de les dues proteïnes.

A la NPC, hi ha un bloqueig del transport de lípid entre els compartiments cel·lulars, de tal forma que aquests s'acumulen als lisosomes i, per tant, es redueix la seva quantitat a altres òrgans. Com a conseqüència, la producció de metabòlits

derivats d'aquests lípids queda disminuïda i la cèl·lula intenta compensar-ho activant la síntesi *de novo*, fet que n'agreuja l'acumulació als lisosomes (Zhang, 2004; Dietschy, 2009).

El colesterol de la membrana plasmàtica dels axons té un paper fonamental en la transmissió de senyals als terminals sinàptics, facilitant la fusió de vesícules presinàptiques i la secreció de neurotransmissors (Petrov, 2016). La deficiència de les proteïnes NPC1 o NPC2, que també es localitzen als endosomes de reciclatge dels terminals sinàptics, alenteix els processos d'endocitosi i exocitosi de neurotransmissors i el funcionament normal de la sinapsis neuronal (Karten, 2006; Hawes, 2010). Concretament, aquests defectes són més pronunciats a les cèl·lules gabaèrgiques, com per exemple, les cèl·lules de Purkinje, on s'hi altera l'equilibri entre senyals excitadors i inhibitoris (Xu, 2010; Rabenstein, 2019).

Les beines de mielina, generades pels oligodendròcits al SNC, són estructures que faciliten la propagació dels impulsos elèctrics als axons de les neurones. Per tal de realitzar aquesta funció, cal que siguin altament aïllants, fet pel qual tenen una concentració de lípids superior al 70%, principalment colesterol (un 45%) (Orth, 2012; Simons, 2016). El bloqueig del transport dels lípids a la malaltia de NPC té un efecte doble al procés de mielinització. Per una banda, impedeix que el colesterol arribi a les beines de mielina, disminuint-hi la concentració d'aquest lípid. Per l'altra, també provoca una alteració de la síntesi de proteïnes associades a la mielina. Un exemple és la proteïna proteolipídica 1 (PLP1, *proteolipid protein 1*), la proteïna més abundant (50%) a la mielina del SNC que necessita unir-se al colesterol per a poder transportar-la correctament i incorporar-la a les beines de mielina (Simons, 2002; Saher, 2015). Com a resultat, s'observen greus alteracions de la maduració dels oligodendròcits, com també la hipomielinització tant del SNC com del sistema nerviós perifèric (SNP) dels ratolins deficients en NPC1 (Takikita, 2004; Limphaibool, 2018; Yang, 2018). Als estudis de ressonància magnètica de pacients humans, també s'ha observat una disminució de la mielinització i una hipoplàsia del cos callós (Palmeri, 1994; Pineda, 2018).

De la mateixa manera, també s'observa una reducció de la producció dels neuroesteroides, els esterols produïts al cervell que intervenen en la modulació dels receptors dels neurotransmissors i en la diferenciació i la supervivència de les neurones (Griffin, 2004). La reducció del neuroesteroide alopregnanolona està associat a la mort de les cèl·lules de Purkinje (Davidson, 2010).

Els lisosomes tenen un paper important en el reciclatge dels components intra i extracel·lulars, però també intervenen en l'homeòstasi del calci, en les cascades de

senyalització i en processos immunològics (*Ballabio, 2009; Parenti, 2015*). L'acumulació de lípids i altres substrats provoca el funcionament anormal del lisosoma i dels processos cel·lulars que en depenen. Aquests processos són indispensables per al funcionament correcte de les cèl·lules, motiu pel qual s'observa una mort progressiva de les cèl·lules afectades (*Platt, 2018*).

El calci actua en nombrosos processos cel·lulars facilitant l'excitabilitat elèctrica, la plasticitat sinàptica, la regulació de l'expressió gènica i la supervivència de les neurones. Així doncs, els errors al metabolisme del calci són comuns en moltes malalties neurodegeneratives (*Berridge, 2010*). Un dels primers lípids que s'acumulen a la NPC és l'esfingosina. L'augment d'aquest lípid provoca alteracions al transport del calci tant al RE com al lisosoma (*Shen, 2012; Tiscione, 2019*). La fusió i transport de les vesícules endocítiques depenen de la sortida del calci del lisosoma i, en conseqüència, contribueix al bloqueig del transport i l'acumulació dels lípids (*Lloyd-Evans, 2010; Platt, 2016*). Un altre efecte provocat pel bloqueig del transport vesicular és la reducció del nombre d'espines dendrítiques (*Tiscione, 2019*). A més a més, l'alteració de l'homeòstasi del calci provoca la desregulació del transport d'altres ions, com el coure (*Baguña Torres, 2019*).

L'autofàgia és un procés pel qual es reciclen orgànuls o proteïnes que no funcionen adequadament. En estat basal, totes les cèl·lules de l'organisme tenen activa l'autofàgia, que s'incrementa en condicions d'estrès cel·lular o de falta d'aminoàcids. Als estudis amb ratolins NPC1, s'ha observat que, tot i haver-hi un increment de la inducció l'autofàgia, hi ha una acumulació de proteïnes poliubiquitinades, fet que indica que aquest procés no funciona eficientment (*Pacheco, 2008*). Un dels processos més afectats pels dèficits de l'autofàgia és la mitofàgia, el reciclatge dels mitocondris. L'acumulació de colesterol als mitocondris de les cèl·lules NPC provoca alteracions morfològiques i estructurals, que resulten en una disminució de la producció d'ATP i un augment de la producció d'espècies reactives de l'oxigen (ERO) (*Torres, 2017*). Les ERO estan implicades en moltes malalties neurodegeneratives a causa de l'elevada vulnerabilitat de les neurones a l'estrès oxidatiu. Paral·lelament, un inconvenient addicional que pateixen els pacients de NPC és la menor capacitat de defensa antioxidant comparat amb la població sana (*Fu, 2010*). Per exemple, s'ha observat que la vitamina E, una vitamina amb funcions antioxidants, s'acumula als lisosomes i se'n redueix la biodisponibilitat a la cèl·lula (*Vázquez, 2012*).

Finalment, una de les característiques més comunes entre les LSDs amb afectació neurològica és la neuroinflamació, que consisteix en l'activació de la micròglia

i els astròcits. No hi ha un consens sobre si l'activació de la micròglia i els astròcits és una conseqüència de la malaltia o si hi participa activament. Per una banda, als ratolins NPC1 s'ha observat que la neurodegeneració al còrtex motor i sensorial i de les cèl·lules de Purkinje al cerebel induïx de forma secundària la neuroinflamació (Lopez, 2013). Per altra banda, l'administració de fàrmacs antiinflamatoris a ratolins NPC1 provoca un increment de la supervivència. Aquest fet indica que la neuroinflamació no és senzillament una conseqüència de la neurodegeneració, sinó que té efectes patològics *per se* (Platt, 2016).

## 2.6. Descripció clínica de la NPC2

La NPC és una malaltia neurovisceral amb un espectre fenotípic molt ampli. L'edat a la qual s'inicien els símptomes és força variable, des de just després del naixement fins als 60 anys, tot i que en més del 60% dels pacients ocorre entre els 2 i els 15 anys (Patterson, 2013). L'edat d'aparició dels símptomes neurològics marca la severitat i la progressió de la malaltia. L'oftalmoplegia vertical supranuclear, és a dir, la dificultat per moure els ulls amunt i avall, és un signe molt característic de la patologia. A més a més, altres signes molt comuns també són l'atàxia cerebel·losa, la disfàgia, la distonia i la demència progressiva (Vanier, 2010; Mengel, 2013; Patterson, 2013; Koens, 2018). L'afectació somàtica és relativament més lleu i es caracteritza principalment per icterícia colestàsica i afectació pulmonar a estadis neonatals, i hepatosplenomegàlia o esplenomegàlia aïllada a la forma infantil de la malaltia. Els pacients que presenten l'inici de la malaltia durant l'etapa juvenil o adulta no acostumen a presentar símptomes somàtics o bé són lleus (Vanier, 2010; Geberhiwot, 2018). A causa de l'acció en tàndem de les proteïnes NPC1 i NPC2, la deleció d'una proteïna o l'altra origina una malaltia clínicament indistingible. Per tant, a la clínica, no s'acostuma a diferenciar entre els subtipus NPC1 i NPC2, sinó que s'engloba com a una sola malaltia, la NPC.

### 2.6.1. Classificació clínica de la NPC

Actualment, la malaltia de Niemann-Pick tipus C es classifica segons l'edat d'inici dels símptomes neurològics, la qual correlaciona bastant bé amb l'esperança de vida i la manifestació clínica que desenvolupen els pacients (Geberhiwot, 2018).

- *Perinatal fatal*: La presentació de la forma neonatal consisteix en una patologia als teixits perifèrics molt severa i ràpida. Aquests pacients desenvolupen hepatosplenomegàlia, la malaltia colestàsica del fetge i els problemes



pulmonars, com la proteïnosi. Acostumen a morir durant els primers 6 mesos de vida a causa dels problemes hepàtics i pulmonars (*Griese, 2010; Yaman, 2015*). Com que la progressió de la patologia perifèrica és molt ràpida, no desenvolupen símptomes neurològics (*Vanier, 2010*). En general, no s'acostuma a incloure als registres o bé s'engloba a dins de la forma infantil precoç pel càlcul de la incidència de les diverses formes de la malaltia.

- *Infantil precoç* (10% dels pacients): Els símptomes apareixen entre els 2 mesos i els 2 anys de vida. Presenten un retràs del desenvolupament motor i cognitiu, hipotonia, espasticitat i tremolors. La patologia somàtica acostuma a estar limitada a l'hepatosplenomegàlia o l'esplenomegàlia. Tenen una esperança de vida inferior als 5 anys (*Vanier, 2010; Geberhiwot, 2018*).
- *Infantil tardana* (30% dels pacients): S'inicia entre els 2 i 6 anys d'edat. Els símptomes neurològics més destacats són la marxa atàxica i maldestre, la cataplexia, el retràs mental, l'oftalmoplegia vertical, l'epilèpsia i la disàrtria. Poden presentar hepatosplenomegàlia lleu. Habitualment, moren abans del 12 anys de vida i, generalment, com a conseqüència de les infeccions pulmonars derivades de la disfàgia (*Vanier, 2010*).
- *Juvenil* (30% dels pacients): Els símptomes es desenvolupen entre els 6 i 15 anys de vida. Presenten dificultats d'aprenentatge i d'escriptura, dèficits d'atenció, cataplexia, atàxia, oftalmoplegia vertical, epilèpsia disàrtria i disfàgia. Molts pacients presenten hepatosplenomegàlia durant la infantesa que desapareix a l'adolescència. L'edat de mort és força heterogènia i alguns pacients arriben a superar els 25 anys de vida (*Vanier, 2010; Patterson, 2013; Geberhiwot, 2018*).
- *Adulta* (30% dels pacients): Els pacients desenvolupen els primers símptomes neurològics a partir dels 15 anys d'edat (generalment abans dels 30 anys). Presenten una simptomatologia neurològica molt similar a la juvenil, però de progressió més lenta. En canvi, aquests pacients desenvolupen problemes psiquiàtrics i conductuals, com ara psicosi, paranoia, al·lucinacions visuals i agressivitat. Poden tenir una esplenomegàlia lleu (*Vanier, 2010; Patterson, 2013*).

### **2.6.2. Patologia neurològica i psiquiàtrica**

A la forma infantil precoç, els primers símptomes inclouen un retràs del desenvolupament motor i la hipotonia, que solen aparèixer a l'edat dels 8-9 mesos i s'agreugen cap als 2 anys. Una part d'aquests infants mai arriba a caminar (*Vanier, 2010*) i, habitualment, presenten un retràs del desenvolupament de la parla (*Geberhiwot, 2018*). També s'ha observat que els pacients presenten leucodistrofia i atròfia cerebral (*Vanier, 2010*).

A la forma infantil tardana, l'atàxia acostuma a ser el primer símptoma (*Mengel, 2013*). A més a més, es comença a fer molt evident la presència d'oftalmoplegia vertical supranuclear, que desenvolupen gairebé el 80% dels pacients (*Patterson, 2013; Geberhiwot, 2018*). Els problemes motors són més greus i comencen a aparèixer episodis relativament freqüents de convulsions i cataplexia gelàstica (*Geberhiwot, 2018*). Aquest símptomes, sumat a una hipotonia molt marcada, condueix a l'aparició de la disfàgia i la disàrtria (*Patterson, 2013*). La disfàgia és un símptoma de gran importància clínica perquè està associada amb la pneumònia per aspiració, un dels principals factors de risc de la mortalitat als pacients amb NPC2 (*Walterfang, 2012*). Per altra banda, també és freqüent el retràs del desenvolupament de la parla, segurament com a conseqüència de la disàrtria (*Mengel, 2013*).

La forma juvenil de la malaltia, possiblement la més prevalent (*Vanier, 2010*), es caracteritza per un deteriorament cognitiu elevat. Els pacients presenten dèficit d'atenció i dificultat amb l'escriptura, que habitualment es manifesten en problemes escolars (*Geberhiwot, 2018*). L'oftalmoplegia vertical supranuclear és habitualment un dels primers símptomes i el presenten pràcticament la totalitat d'aquests pacients (*Vanier, 2010*). A mesura que la malaltia va progressant i afecta el tronc de l'encèfal, els moviments horitzontals de l'ull també poden estar afectats (*Evans, 2017*). Els problemes motors són especialment severs, en comparació amb la forma infantil tardana, i presenten un grau més elevat d'atàxia, disfàgia i disàrtria. En aquesta etapa, l'empitjorament de la disàrtria ocasiona que alguns pacients deixin de parlar (*Vanier, 2010*), mentre que els episodis de cataplexia i convulsions presenten una incidència inferior respecte a les formes infantils (*Patterson, 2013*). Tant a la forma juvenil com a la infantil, els pacients afectats tenen una elevada freqüència d'episodis epilèptics (*Evans, 2017*).

Finalment, a la forma d'aparició adulta, els símptomes neurològics més freqüents són l'atàxia cerebel·losa, la disàrtria, l'oftalmoplegia vertical supranuclear i la disfàgia (*Vanier, 2010; Mengel, 2013*). De fet, però, els trastorns psiquiàtrics són el conjunt de

síntomes més característics d'aquesta forma, que poden aparèixer abans que els problemes motors o el deteriorament cognitiu. Manifesten una àmplia varietat d'alteracions psiquiàtriques, des de la psicosi en forma de deliris, fins a la paranoia o les al·lucinacions visuals i auditives (*Vanier, 2010; Nia, 2014*). Aquests símptomes acostumen a ser resistents a la medicació i poden provocar una depressió, l'aïllament social dels individus afectats i, fins i tot, problemes laborals (*Nia, 2014*). Per altra banda, també s'han documentat pacients amb trastorn obsessiu-compulsiu i trastorn bipolar (*Evans, 2017*).

En general, hi ha una incidència força elevada de sordesa (*Vanier, 2010; Mengel, 2013; Bonnot, 2019*). La recomanació mèdica és fer-ne un seguiment anual, però no hi ha un tractament específic (*Geberhiwot, 2018*).

### **2.6.3. Patologia perifèrica**

La patologia als teixits perifèrics és relativament més lleu que la patologia neurològica i els efectes psiquiàtrics de la NPC. De fet, un 15% dels pacients mai manifesten la patologia somàtica relacionada amb aquesta malaltia (*Vanier, 2010*). En cas de ser-hi, sempre apareixen abans que les manifestacions neurològiques (*Evans, 2017*). Per altra banda, el component somàtic és més freqüent i més greu a les formes neonatals i infantils, mentre que disminueix la incidència i la severitat a les formes juvenils i adolescent/adulta (*Patterson, 2013; Geberhiwot, 2018*).

La forma neonatal és la que mostra una afectació somàtica més greu. El signe més evident és la icterícia colestàsica, que apareix durant els primers dies de vida i es resol de forma espontània al voltant dels 2-4 mesos de vida (*Vanier, 2010*). Més de la meitat dels pacients desenvolupa esplenomegàlia, habitualment acompanyada d'hepatomegàlia. Aproximadament un 10% dels pacients de la forma neonatal també presenta hidropesia fetal (edema o retenció de líquids al fetus) al naixement i desenvolupa una insuficiència hepàtica i respiratòria molt severa (*Patterson, 2013; Geberhiwot, 2018*). Com a resultat d'aquest quadre clínic tan greu, els pacients moren abans dels 6 mesos, habitualment la mort està ocasionada per la proteïnosis als pulmons (*Griese, 2010; Yaman, 2015*). Proporcionalment, la forma neonatal fatal té una incidència superior als pacients de la NPC2 respecte els de la NPC1 (*Vanier, 2010; Patterson, 2012; Sheth, 2017*).

La incidència i la severitat de la patologia perifèrica és menor als pacients de la resta de formes de NPC. És habitual que els pacients tinguin una història clínica que

inclou la presència d'icterícia, esplenomegàlia o hepatosplenomegàlia durant la infantesa, que es redueix o desapareix quan s'inicien els símptomes neurològics. De fet, molts pacients amb la forma adulta no presenten cap símptoma somàtic o bé només una esplenomegàlia lleu (*Patterson, 2013; Evans, 2017; Geberhiwot, 2018*).

## 2.7. Diagnòstic de la NPC

A causa de l'alta heterogeneïtat de la NPC pel que fa a la simptomatologia neurològica, psiquiàtrica i somàtica i a l'edat d'inici dels símptomes, el diagnòstic es pot endarrerir fins a 4-5 anys després de l'inici dels primers símptomes neurològics (*Patterson, 2012; Mengel, 2013*). Alguns adults que principalment presenten trastorns psiquiàtrics no s'han arribat mai a diagnosticar com a pacients de NPC (*Vanier, 2010*). Tot i això, l'oftalmoplegia vertical supranuclear o el deteriorament cognitiu conjuntament amb l'esplenomegàlia aïllada, l'atàxia o els símptomes de psicosi són una combinació de símptomes que eleva molt la sospita que el pacient afectat pugui presentar NPC (*Mengel, 2013*). Quan la sospita clínica és prou elevada o s'ha detectat algun cas a algun familiar directe, el consens clínic actual indica que la primera prova recomanada és l'anàlisi dels biomarcadors, seguit de la confirmació del diagnòstic mitjançant l'estudi de les mutacions o la prova de la filipina (*Geberhiwot, 2018*).

La gran majoria de biomarcadors s'analitzen mitjançant l'espectrofotometria de masses. Es tracta d'una tècnica ràpida, senzilla i disponible pe la gran majoria de centres que permet treballar amb mostres relativament fàcils d'obtenir, com ara el plasma, l'orina, el líquid amniòtic o la sang seca recollida en un paper (DBS, *Dried Blood Spot*).

- *Oxisterols*: El colestano-3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -triol (C-triol) és el més sensible i específic, tot i que també s'utilitza el 7-cetocolesterol. Presenten la limitació que també estan augmentats a d'altres malalties, com a la Niemann-Pick A/B o a la deficiència de la lipasa àcida lisosòmica, fet que provoca alguns falsos positius (*Porter, 2010; Jiang, 2011*).
- *Liso-esfingolípid*s: Els liso-esfingolípid més estudiats són l'esfingosilfosforilcolina (Lyso-SM) i el seu anàleg Lyso-SM-509 (*Welford, 2014; Kuchar, 2017*). Una elevada ràtio Lyso-SM-509/Lyso-SM és un indicador de la NPC i presenta una elevada especificitat (*Geberhiwot, 2018*). La determinació dels esfingolípid es realitza al plasma i al líquid amniòtic, ja que no és molt estable als DBS (*Kuchar, 2017; Pettazzoni, 2017*).
- *Sals biliars*: La sal biliar més caracteritzada és la 3 $\beta$ , 5 $\alpha$ , 6 $\beta$ -trihidroxicolanoilglicina (un derivat del C-triol). Són uns metabòlits incorporats molt

recentment al diagnòstic clínic i encara no estan suficientment validats. Tot i així, com que presenten una estabilitat elevada a les mostres d'orina, plasma i DBS, i són molt específics per a la NPC, alguns centres mèdics l'han començat a introduir als seus protocols de diagnòstic (*Jiang, 2016; Geberhiwot, 2018*).

Un cop s'obté el resultat positiu per la NPC amb l'anàlisi per biomarcadors, es procedeix a l'estudi genètic molecular per tal d'identificar les mutacions del pacient i confirmar definitivament el seu diagnòstic. La presència de dues variants descrites com a patogèniques confirma automàticament el diagnòstic. Quan només es localitza un al·lel mutat o mutacions d'efecte desconegut, també cal seqüenciar el DNA complementari (cDNA) per tal de verificar si hi ha una producció correcta del transcrit. Si aquestes proves complementàries no donen un resultat determinant, s'acostuma a dur a terme la prova de la filipina (*Patterson, 2012; Geberhiwot, 2018*).

La prova de la filipina va ser durant molt de temps el test de referència pel diagnòstic de la NPC (*Vanier, 2015*). Actualment, ha caigut en desús perquè és una tècnica lenta i laboriosa que requereix la tinció de fibroblasts cultivats en un medi enriquit amb LDL amb el complex de filipina (*Patterson, 2012; Geberhiwot, 2018*). La filipina consisteix en una barreja heterogènia de compostos químics pertanyents als antibiòtics macròlids polièns, els quals s'uneixen de forma exclusiva al colesterol no esterificat. Quan la filipina interacciona amb el colesterol lliure, presenta un caràcter fluorescent amb excitació/emissió de 360/480 nm. Als talls histològics o a les cèl·lules en cultiu fixades dels pacients amb NPC, s'observa un increment del marcatge de filipina, especialment a les vesícules perinuclears (*Kruth, 1986*). Tot i que la tinció en si permet diagnosticar clarament la NPC quan el marcatge és molt positiu, hi ha una part dels pacients afectats per la NPC que presenten un marcatge menys intens, anomenats "filipina variant", i aquests són més difícils de diagnosticar per aquesta tècnica. Per altra banda, també s'ha detectat que la prova de la filipina també pot ser positiva, però amb una intensitat més baixa, en heterozigosis o als pacients amb NPA/B. En aquests casos, distingir un pacient "filipina variant" d'un heterozigot amb marcatge positiu o d'un pacient amb NPA/B és bastant difícil. No obstant això, continua essent una tècnica molt vàlida per a estudiar els efectes de noves mutacions i variants genètiques (*Geberhiwot, 2018*).

## 2.8. Models animals de la NPC2

### 2.8.1. Model murí de la NPC2

El 2004, Sleat *et al.* van descriure el primer model de la malaltia de NPC2. L'estratègia per a generar el *knock-out* (KO) per la NPC2, que havia de substituir la cisteïna 42 per un codó stop, va donar lloc a la inserció d'una part del vector de recombinació a l'intró 2 del gen *Npc2* a causa d'una recombinació homòloga aberrant. Com a resultat, es va generar un animal hipomorf que per *splicing* alternatiu permetia la síntesi del voltant del <4% del mRNA dels animals sans (WT, *wild-type*) (Sleat, 2004).

Els animals hipomorfs presenten un augment de pes normal fins als 55 dies d'edat, a partir del qual cau ràpidament fins a la mort. Als 55 dies d'edat, també hi ha altres símptomes molt evidents, com l'atàxia i altres problemes motors. Aquests ratolins, amb un fons mixt C57BL6/129SvEv/BALBc, viuen fins als 130 dies d'edat (Sleat, 2004). A l'estudi dels paràmetres bioquímics, els animals hipomorfs presenten una acumulació del colesterol, l'esfingomielina, la glucosilceramida, la lactosilceramida i els gangliòsids GM2, GM3 i asialo-GM2 al fetge; mentre que a l'encèfal s'hi acumula principalment GM2 i GM3. La tinció de filipina revela l'acumulació del colesterol no esterificat al soma de les neurones de forma generalitzada a tot l'encèfal (Sleat, 2004). Al cerebel, el nombre de les cèl·lules de Purkinje comença a decreïxer a les 7 setmanes, amb una caiguda dràstica a les 11 setmanes d'edat. Les cèl·lules de Purkinje que sobreviuen presenten esferoides axonals tant a la capa granulosa com a la matèria blanca del cerebel (Sleat, 2004).

Aquest model murí és similar a altres models murins de la NPC1, però presenta un inici i desenvolupament de la patologia més endarrerit a causa de ser un model animal hipomorf, amb una presència residual del mRNA de la *Npc2*.

### 2.8.2. Model felí de la NPC2

El 2014, Zampieri *et al.* van documentar el cas de dos gats afectats per la malaltia de NPC2 a causa d'una mutació a la regió intrònica (c.82+5G>A) del gen *NPC2*, que provocava una inserció de 35 aa entre les posicions 28 i 29 (p.G28\_S29ins35). El fenotip dels animals és similar a l'observat al model felí de la NPC1 i, per tant, similar a la forma juvenil de la patologia humana (Zampieri, 2014).

Als 3 mesos d'edat, els dos gats presentaven tremolors, distonia i atàxia. Un dels gats va perdre l'habilitat de sostenir-se dret als 6 mesos d'edat i va morir als 10 mesos,

mentre que l'altre gat el van haver d'eutanasiar als 21 mesos d'edat. Als estudis *post mortem*, es van observar l'increment de vacúols citoplasmàtics a les neurones, una marcada gliosis a la substància negra, el tàlem i el mesencèfal i la degeneració de la matèria blanca. El número de les cèl·lules de Purkinje era reduït i presentaven esferoïdes amb acumulacions d'agregats ubiquitinats. Al fetge, tant els hepatòcits com les cèl·lules de Kupffer presentaven un aspecte espumós. De la mateixa manera, als alvèols i l'interstici pulmonar també s'hi van descriure macròfags espumosos (*Zampieri, 2014*). Tot i que la simptomatologia i les anàlisis bioquímiques el feien un bon model animal per a la NPC2, no es va poder establir cap colònia i, per tant, no es disposa de cap model felí de la NPC2.

## **2.9. Tractaments per a la NPC2**

La malaltia de NPC2 actualment no disposa de cura. Tanmateix, els tractaments simptomàtics o altres tractaments que modifiquin la progressió de la malaltia tenen el potencial d'incrementar l'estat del benestar dels pacients i possiblement alenir la progressió de la malaltia.

### **2.9.1. Tractament simptomàtic**

El tractament simptomàtic és com es coneix al conjunt d'estratègies que, sense corregir el defecte genètic, permeten augmentar la qualitat de vida del pacient. Com que es tracta d'una malaltia amb una simptomatologia molt complexa, l'abordatge clínic és multidisciplinar (*Geberhiwot, 2018*).

Hi ha tota una sèrie de símptomes de la malaltia que són bastant controlables amb el tractament farmacològic. Per exemple, els atacs epilèptics generalment es tracten amb valproat de sodi, lamotrigina i levatiracetam, que són mitjanament efectius als estadis inicials, però perden eficàcia als estadis més avançats de la malaltia (*Munoz, 2014*). La cataplexia gelàstica respon correctament als estimuladors del SNC o als antidepressius tricíclics, mentre que els anticolinèrgics són especialment útils pel tractament de la distonia i les tremolors (*Vanier, 2010; Geberhiwot, 2018*).

Les dificultats per a deglutir a causa de la disfàgia s'han d'avaluar periòdicament. Un dels principals riscos associats a la disfàgia són els problemes pulmonars derivats de l'aspiració del menjar, com ara les infeccions pulmonars recurrents (*Walterfang, 2012*). Les mesures inicials inclouen la utilització d'una dieta tova o els canvis posturals

per a facilitar la deglució. No obstant això, a mesura que progressa la patologia, no és estrany haver de realitzar intervencions quirúrgiques com la gastrostomia (Vanier, 2010; Patterson, 2012). L'afectació pulmonar primària derivada de la pròpia malaltia és poc habitual i es tracta amb broncodilatadors (Geberhiwot, 2018).

El deteriorament cognitiu és un dels símptomes més difícils de pal·liar (Geberhiwot, 2018). Es recomana una escolarització per alumnes amb necessitats especials per aquells pacients diagnosticats amb les formes infantils i juvenils (Vanier, 2010). Per altra banda, els símptomes psicòtics són difícils de tractar farmacològicament i els pacients no sempre responen al tractament. En canvi, si que hi ha un benefici terapèutic amb l'administració d'inhibidors de la recaptació de la serotonina i el valproat de sodi per al tractament de la depressió i el síndrome bipolar, respectivament (Evans, 2017). Als pacients amb catatonía, la teràpia electro-convulsiva s'ha utilitzat amb èxit, i les alteracions del son, com la narcolèpsia i la inversió del son, es tracten amb melatonina, un regulador del cicle circadiari (Patterson, 2012).

## **2.9.2. Teràpia de reducció de substrat**

Les teràpies de reducció de substrat tenen com a finalitat la reducció de la síntesi dels compostos que s'acumulen al lisosoma, o bé facilitar-ne la sortida del lisosoma.

### **2.9.2.1. Miglustat**

Tot i que la malaltia de NPC està considerada com una malaltia que afecta al metabolisme i al transport del colesterol, la realitat és que hi ha molts altres lípids que s'acumulen i participen en la patogènia (Lloyd-Evans, 2010). Al cervell dels pacients i els models animals de la malaltia, s'ha observat un increment molt elevat dels nivells dels gangliòsids GM2 i GM3, la lactosilceramida i la glucosilceramida (Zervas, 2001a; Pineda, 2018). L'imminosucre miglustat (*N-butyl-deoxynojirimycin*) és una molècula petita amb la capacitat de creuar la BHE i que inhibeix de forma reversible la glucosilceramida sintasa (Sévin, 2007). Aquest enzim catalitza el primer pas de la via de síntesi dels glicoesfingolípid (Platt, 1994). Amb el nom comercial de Zavesca (Actelion Pharmaceuticals Ltd), aquest és l'únic fàrmac aprovat a la unió europea pel tractament de la NPC (des del 2009) (Patterson, 2012). El tractament amb miglustat ha demostrat eficàcia bioquímica, ja que és capaç de reduir la concentració de GM2 i GM3 i millorar l'homeòstasi intracel·lular del calci, segurament com a conseqüència de la reducció de l'esfingosina. A més, també s'ha observat una disminució de la mortalitat de les cèl·lules



de Purkinje i una millora o estabilització de diversos símptomes, com ara la disfàgia o l'oftalmoplegia vertical supranuclear. Aquests beneficis en l'estabilització dels símptomes neurològics són més habituals en pacients diagnosticats amb les formes més tardanes de la patologia (Pineda, 2018). La recomanació clínica és que el tractament amb miglustat s'hauria d'iniciar a partir de l'inici dels símptomes neurològics, ja que no hi ha un benefici clar en els símptomes somàtics (Geberhiwot, 2018). Cal tenir en compte, però, que no es tracta d'un tractament que corregeix l'error genètic sinó que només permet l'estabilització de la malaltia (Pineda, 2018).

### 2.9.2.2. Ciclodextrines

Les ciclodextrines són uns oligosacàrids cíclics en forma de torus amb una obertura central relativament hidrofòbica. Gràcies a l'exterior hidrofílic, s'utilitzen àmpliament per a solubilitzar compostos hidrofòbics en solucions aquoses (Davidson, 2010). La 2-hidroxiopropil- $\beta$ -ciclodextrina (HPBCD) és un vehicle que s'utilitza en cultius cel·lulars per a administrar colesterol o bé extreure'l de la membrana plasmàtica (Liu, 2009). Els primers estudis amb HPBCD han demostrat que una única administració subcutània als ratolins *Npc1<sup>-/-</sup>* a 7 dies d'edat provoca la mobilització del colesterol atrapat als lisosomes, la disminució del colesterol total, la supressió de la síntesi *de novo* i l'activació de les vies de degradació del colesterol. A més a més, també disminueix els nivells de diversos marcadors d'inflamació al fetge i a l'encèfal, així com una disminució de la neurodegeneració i un augment de l'esperança de vida d'aproximadament el 30% respecte els animals no tractats (Liu, 2009). Un altre estudi, realitzat tant als ratolins *Npc1<sup>-/-</sup>* com *Npc2<sup>-/-</sup>*, ha demostrat la necessitat d'iniciar el tractament amb HPBCD a estadis primerencs i de forma continuada. Quan el tractament s'inicia als 7 dies d'edat, amb una administració de HPBCD cada 2 dies, s'aconsegueix disminuir la degeneració de les cèl·lules de Purkinje respecte els animals no tractats. Tot i això, no s'aconsegueix preservar una densitat similar als animals WT, fet que indica la reduïda capacitat de l'HPBCD per creuar la BHE (Davidson, 2009).

Un dels inconvenients que presenta l'HPBCD és que no travessa fàcilment la BHE i cal administrar-la de forma sistèmica a unes dosis molt altes o bé injectar-la directament al SNC (Calias, 2018). Per altra banda, el tractament amb l'HPBCD provoca una pèrdua progressiva de l'audició, fet que s'ha demostrat als estudis de ratolins i gats model de la malaltia (Ward, 2010; Crumling, 2012). Recentment, s'estan desenvolupant noves teràpies amb altres tipus de ciclodextrines que no presentin ototoxicitat (Davidson, 2016). Tot i aquestes limitacions, s'ha desenvolupat un assaig clínic amb el tractament

d'HPBCD. En la fase I/IIa, els pacients van rebre una administració intratecal de l'HPBCD a una dosi de 50 a 400 mg un cop al mes. El tractament va demostrar un increment de la concentració de 24-HC, utilitzat com a marcador d'eficàcia terapèutica, i un perfil correcte de seguretat (Ory, 2017). Malauradament, quan el tractament va avançar cap a la fase IIb/III, els 50 pacients tractats amb una dosi intratecal de 200 mg/kg cada dues setmanes no van mostrar millores significatives respecte el grup que va rebre placebo (Bräuer, 2019).

### 2.9.2.3. Fàrmacs reductors del colesterol

Una de les primeres aproximacions per al tractament de la NPC va ser amb fàrmacs reductors del colesterol. S'han utilitzat diversos fàrmacs amb aquest efecte: la colestiramina, l'àcid nicotínic, la lovastatina o el dimetil sulfòxid tant en humans com en ratolins (Patterson, 1993). Aquests tractaments provoquen una reducció dels nivells del colesterol circulant i hepàtic, però sense cap benefici neurològic (Erickson, 2000; Reid, 2008). Per tant, no es consideren un tractament efectiu de la patologia (Madra, 2010; Geberhiwot, 2018). No obstant això, s'ha continuat estudiant l'efecte de les estatines a la NPC. Recentment, s'ha observat un increment de la diferenciació i maduració dels oligodendròcits dels ratolins NPC1 tractats amb lovastatina, això sí, només s'ha analitzat en cultius cel·lulars (Yang, 2018).

### **2.9.3. Transplantament de medul·la òssia**

Com que la NPC2 és una proteïna soluble que conté residus M6P, els pacients amb NPC2 es poden beneficiar del transplantament de cèl·lules mare hematopoètiques o de medul·la òssia (Patterson, 2012). Gràcies al principi de la correcció creuada, els macròfags derivats de les cèl·lules mare del donant poden actuar com a font productora de la NPC2 i ser captada per les cèl·lules deficientes del pacient. Només hi ha 2 casos descrits de transplantament de medul·la òssia. Un pacient diagnosticat amb la forma neonatal de la NPC2 va rebre als 16 mesos d'edat un transplantament al·logènic de medul·la òssia. Els dos primers mesos posteriors al transplantament va mostrar una simptomatologia pulmonar greu, que va millorar quan es va augmentar la immunosupressió. Als 3 anys, el pacient mostrava un desenvolupament motor i neurològic correcte, una funció respiratòria i auditiva molt bona i només un cert retràs del desenvolupament de la parla. Així doncs, presentava una millora molt significativa respecte a l'evolució d'altres pacients no tractats amb la mateixa mutació i es va

considerar un èxit (*Bonney, 2010*). L'altre pacient tractat va morir 4 mesos després del transplantament de medul·la òssia arran dels problemes pulmonars provocats per una infecció amb adenovirus (*Verot, 2007*). No és una tècnica contemplada a les últimes recomanacions per al tractament de la NPC2, perquè està limitada a la disponibilitat de donants compatibles i està associada a una elevada mortalitat, especialment quan apareix l'anomenada reacció de l'empelt contra l'hoste (*Geberhiwot, 2018*).

Així doncs, com que els últims avenços en el tractament de la malaltia de NPC2 únicament han suposat una millora en la qualitat de vida i la salut dels pacients, i els estudis recents indiquen que no s'ha aconseguit una millora real de la seva supervivència, la transferència d'una còpia correcta del gen mutat mitjançant la teràpia gènica podria ser una bona alternativa pel tractament de la NPC2.

### 3. TERÀPIA GÈNICA

La teràpia gènica consisteix en la transferència de material genètic a les cèl·lules diana del pacient amb la finalitat de contrarestar o substituir l'expressió d'un gen no funcional i revertir el fenotip patològic. Les malalties monogèniques, i en especial les LSD, presenten determinades característiques favorables que els permet ser tractades i potencialment curades amb la teràpia gènica. A moltes LSD, uns nivells baixos d'expressió de la proteïna són suficients per produir una millora clínica substancial. A més a més, es beneficien del fenomen de la correcció creuada on, gràcies al fet que moltes proteïnes lisosòmiques són secretables, les cèl·lules corregides són capaces de sintetitzar i distribuir la proteïna per l'organisme i arribar a cèl·lules no corregides (Ruzo, 2012b; Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017).

#### 3.1. Classificació dels tipus de teràpia gènica

La teràpia gènica es pot classificar segons el tipus d'administració: la teràpia gènica *ex vivo* i la teràpia gènica *in vivo*. La teràpia *ex vivo* consisteix en l'obtenció de cèl·lules del pacient, habitualment cèl·lules hematopoètiques, per modificar-les genèticament *in vitro* i posteriorment ser reimplantades de nou al pacient. En canvi, en l'administració *in vivo*, la correcció de les cèl·lules diana es realitza *in situ* després d'injectar-li el material terapèutic directament al pacient (Chira, 2015).

Una altra manera de classificar la teràpia gènica és segons el tipus de vehicle utilitzat, que pot ser d'origen viral o no viral. En la teràpia gènica amb vectors no virals, les cèl·lules es modifiquen mitjançant uns procediments físics, com ara la introducció forçada de DNA per electrotransferència, o químics, mitjançant la seva encapsulació amb lípids o polímers catiónics. Generalment, però, s'assoleixen uns nivells de transducció molt baixos i transitoris (Chira, 2015).

Per altra banda, la teràpia gènica amb vectors virals aprofita la capacitat dels virus per introduir el material genètic de forma eficaç a determinats tipus cel·lulars. Així doncs, els vectors virals són derivats de virus salvatges que permeten assolir uns nivells de transducció habitualment superiors als dels mètodes no virals (Guo, 2012; Hardee, 2017). Es disposa de vectors virals basats en diversos virus salvatges, els més habituals són: els adenovirus, els retrovirus, els lentivirus, els virus adenoassociats o l'herpesvirus. Els vectors virals compleixen unes característiques que els fan més interessants segons la seva aplicació, com ara la transducció transitòria o estable de la cèl·lula diana, el

tropisme cel·lular, la immunogenicitat, la capacitat d'infectar cèl·lules quiescents o en divisió, o bé si són integratius o es mantenen de forma episomal (Lundstrom, 2018).

Tenint en compte les característiques de la NPC2, els vectors virals adenoassociats (AAV, *Adeno-associated virus*) són els més adequats, ja que permeten l'expressió del transgèn en una àmplia varietat de teixits de forma estable al llarg del temps i disposen d'un excel·lent perfil de seguretat. A més a més, són uns vectors molt ben caracteritzats que ja s'han utilitzat àmpliament a diversos protocols de teràpia gènica *in vivo* per a altres malalties en clínica humana (Mingozzi, 2011; Piguet, 2017).

### 3.2. Vectors virals adenoassociats

Els vectors AAV deriven dels virus de la família *Parvoviridae*, els anomenats virus adenoassociats, que formen part del gènere *Dependoviridae*. Es van descobrir per primera vegada com a contaminants de les preparacions d'Adenovirus, ja que necessiten la coinfecció de virus accessoris (Adenovirus o Herpesvirus) per completar el seu cicle vital (Atchison, 1965; Hoggan, 1966). Actualment, no es coneix cap patologia humana provocada pels AAV, fet que els fa uns virus no patogènics i poc immunogènics (Lentz, 2012). Per altra banda, els AAV són capaços d'infectar tant les cèl·lules quiescents com en divisió, on s'hi mantenen de forma episomal (Samulski, 2014). Aquestes característiques, juntament amb la capacitat de donar lloc a una expressió estable del transgèn a llarg termini, permeten que els vectors virals AAV siguin segurs i presentin una baixa probabilitat que apareguin efectes secundaris als protocols de teràpia gènica per la clínica humana (Mingozzi, 2011; Buchlis, 2012)

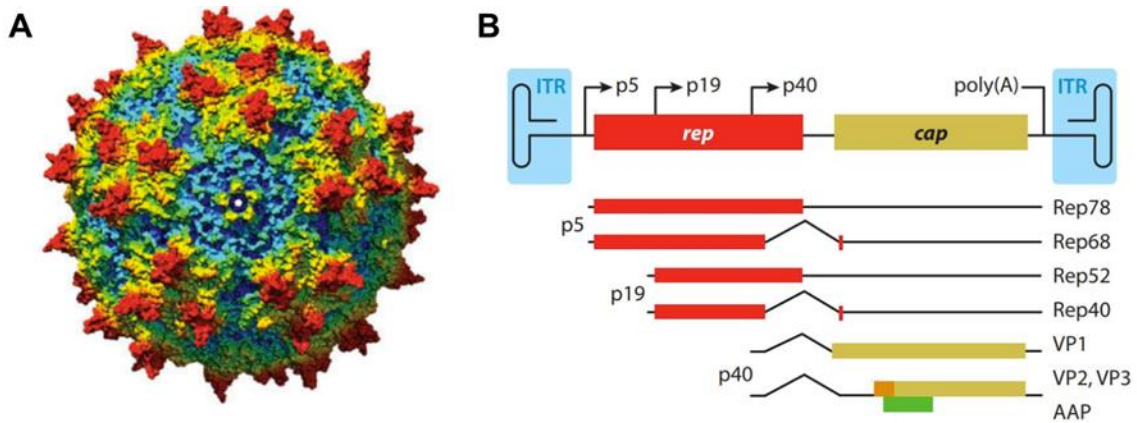
#### 3.2.1. Biologia dels virus adenoassociats

Els virus adenoassociats són virus sense embolcall lipídic amb una càpsida icosaèdrica de 25 nm, molt resistent a la calor, al pH àcid i a les proteases. Tenen un genoma de DNA de cadena senzilla d'unes 4.7 kb de longitud (Wang, 2019). Tant la cadena positiva com la negativa poden ser empaquetades a dins la càpsida proteica del virus, ja que ambdues són funcionals. Les partícules virals madures només contenen les proteïnes de la càpsida proteica i el genoma viral (Büning, 2003; Samulski, 2014).

El genoma viral conté 3 promotors diferents i una seqüència de poliadenilació compartida que originen 3 marcs oberts de lectura (ORF, *Open reading frame*) diferents (Figura 8). L'expressió des de cada un dels promotors codifiquen per un total de 8

proteïnes, classificades com a proteïnes Rep, necessàries per la replicació, o proteïnes Cap, ubicades a la càpsida proteica del virus (Naso, 2017). Les proteïnes Rep inclouen la Rep78, Rep68, Rep52 i Rep40 que se sintetitzen des dels promotors p5 i p19 per *splicing* alternatiu de l'ORF Rep. La Rep78 i la Rep68 són necessàries per la replicació del genoma viral i tenen activitat endonucleasa, helicasa i ATPasa. Mentre que les dues més petites, la Rep 52 i la Rep40, només tenen activitat helicasa i són necessàries per l'encapsidació del genoma viral (Büning, 2003; Samulski, 2014). El promotor p40 regula la síntesi de les proteïnes Cap per *splicing* alternatiu de l'ORF Cap (Figura 8). Les proteïnes VP1, VP2 i VP3 es troben a la càpsida a una ràtio 1:1:10 (Wang, 2019). Les proteïnes VP1 i VP2 contenen la seqüència d'aminoàcids de la VP3 i incorporen, a més a més, una senyal de localització nuclear i, només a la VP1, una regió N-Terminal amb activitat fosfolipasa A2. Aquestes funcions són claus per la infectivitat del virus. El mRNA que codifica per la VP2 i VP3 conté un segon ORF que codifica per la proteïna activadora de l'assemblatge (AAP, *Assembly-Activating Protein*). La funció d'aquesta proteïna és facilitar l'entrada de la VP3 al nucli i promoure la maduració de la càpsida proteica (Büning, 2003; Samulski, 2014).

A cada extrem, flanquejant el genoma viral, s'hi troben unes seqüències en forma de T, les repeticions terminals invertides (ITR, *Inverted Terminal Repeats*). Les ITR, de 145 bp de longitud, són l'origen de replicació i la senyal d'encapsidació del genoma viral (Figura 8). Són les úniques seqüències que es necessiten en *cis* per a generar els vectors AAV. En presència de la proteïna Rep, les ITR tenen certa activitat promotora i amplificadora, però, als vectors AAV (que no contenen Rep), cal incorporar promotors a les cassetts d'expressió del transgèn per tal que es pugui expressar correctament (Büning, 2003; Samulski, 2014).



**Figura 8. Representació esquemàtica de la càpsida i el genoma dels AAV. (A)** Estructura tridimensional de la càpsida de l'AAV2 generada per cristallografia. En vermell es mostren els aminoàcids més superficials i en blau els més propers a l'interior de la càpsida. **(B)** Estructura del genoma dels AAV, on es mostra les ITR (blau) flanquejant els ORF dels gens *rep* (vermell), *cap* (groc i taronja) i AAP (verd). La seqüència addicional que té la VP2 respecte la VP3 s'indica en taronja. Adaptat de Samulski, 2014.

Quan l'AAV interacciona amb el seu receptor, s'internalitza mitjançant les vesícules de clatrina i s'incorpora als endosomes primerencs. A mesura que els endosomes van madurant i s'acidifiquen, el canvi de pH provoca un canvi conformacional a la proteïna VP1 de la càpsida que n'activa l'activitat fosfolipasa A2 (Wang, 2019). D'aquesta manera, els AAV s'escapen dels endosomes i poden introduir el seu genoma al nucli de la cèl·lula (Büning, 2003). En presència d'un virus auxiliar, l'AAV és capaç de replicar el seu genoma, sintetitzar les proteïnes virals i generar noves partícules virals. En canvi, si no hi ha un virus auxiliar, els AAV poden persistir majoritàriament en forma episomal al nucli com a monòmers o bé concatèmers. A més a més, també poden integrar-se al genoma, tot i que no és un procés gaire freqüent (Nakai, 2003; Naso, 2017). La integració es produeix per l'acció de les proteïnes Rep, principalment al locus anomenat AAVS1 que es localitza al cromosoma 19 humà (19q13.3-qter) (Chira, 2015; Wang, 2019).

### 3.2.2. Producció dels vectors AAV recombinants

Com que l'únic element en *cis* necessari per a l'encapsidació dels AAV són les ITR, es poden substituir els gens *rep* i *cap* (aproximadament el 96% del genoma viral) per la casset d'expressió del gen d'interès (Büning, 2003). La casset d'expressió ha de contenir uns elements determinats per a que es pugui sintetitzar la proteïna: un promotor (habitualment amb un amplificador i un intró), el gen o la regió codificant (*cds*, *coding sequence*) i la senyal de poliadenilació (poliA) (Figura 9). Inclouent les ITR, el constructe

no hauria de superar les 4.7 kb per tal que es pugui encapsidar correctament (Samulski, 2014).

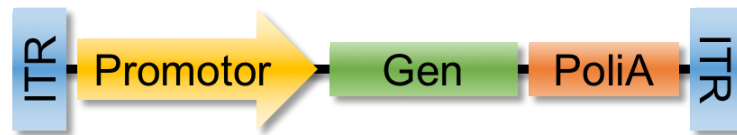


Figura 9. Estructura de la casset d'expressió flanquejada per les ITR dels vectors AAV.

Antigament, la producció del vector viral AAV es duia a terme mitjançant la utilització d'un virus auxiliar, que donava lloc a unes preparacions virals amb un cert grau de contaminació per part d'aquest virus auxiliar. Aquest inconvenient es va resoldre amb el sistema de la triple transfecció de cultius cel·lulars, que permet aportar les proteïnes dels virus auxiliars per a la producció dels AAV mitjançant determinats plasmidis (Wang, 2019). Així doncs, hi ha el plasmidi amb la casset d'expressió flanquejada per les ITR, un altre que conté els gens auxiliars de l'adenovirus (E1, E2A, E4 i VA), i finalment, el tercer plasmidi que conté els gens Rep i Cap dels virus AAV WT. Quan els 3 plasmidis es co-transfecten en cèl·lules HEK 293, s'aconsegueix l'encapsidació del gen d'interès flanquejat per les ITR (Büning, 2003). Les partícules virals se separen posteriorment de les restes cel·lulars per centrifugació. Aquest protocol consisteix en la precipitació de les partícules virals amb polietilè glicol (PEG), seguit de la centrifugació amb dos gradients diferents de clorur de cesi. D'aquesta manera, s'aconsegueix separar la majoria de les càpsides buides i altres contaminants proteics (amb una densitat inferior) de les càpsides plenes, i aconseguir uns títols molt elevats de les preparacions virals. Les preparacions obtingudes amb aquest protocol presenten una millor eficàcia en la transducció *in vivo* (Ayuso, 2010).

Com que la majoria de constructes utilitzen les ITR de l'AAV2, un serotip molt ben caracteritzat, el plasmidi pRepCap utilitza la Rep de l'AAV2. En canvi, segons quin sigui el tipus cel·lular que es vulgui modificar genèticament, es pot utilitzar els gens Cap de diferents serotips d'AAV (Rabinowitz, 2002; Grimm, 2008). Les proteïnes Cap són les encarregades d'interaccionar amb els receptors cel·lulars i, per tant, són les que estableixen el tropisme dels vectors. A la Taula 3 es detalla els receptors i el tropisme dels vectors AAV més utilitzats.



**Taula 3. Origen, receptors, coreceptors i tropisme d'alguns dels AAV més utilitzats en preclínica.**

Serotip	Origen	Receptor i co-receptors	Tropisme
AAV1	Humà o PNH	Àcid siàlic N-unit	Múscul esquelètic, SNC, retina, pàncrees, cor, fetge
AAV2	Humà	HS, FGFR1, HGFR, LamR, integrines $\alpha v\beta 5$ i $\alpha 5\beta 1$	Cèl·lules musculars vasculars, múscul esquelètic, SNC, fetge, ronyó, retina
AAV3	Humà o PNH	HS, FGFR1, HGFR, LamR	Múscul esquelètic, hepatocarcinoma, oïda interna
AAV4	PNH	Àcid siàlic O-unit	SNC (ependimòcits), retina, pulmó, fetge
AAV5	Humà	Àcid siàlic N-unit, PDGFR	Múscul esquelètic, SNC (ependimòcits), pulmó, retina, fetge
AAV6	Humà	HS, Àcid siàlic N-unit, EGFR	Múscul esquelètic, cor, pulmó
AAV7	Macaco rhesus	Desconegut	Múscul esquelètic, SNC, retina, fetge
AAV8	Macaco rhesus	LamR	Fetge, SNC, retina, pàncrees, cor, múscul esquelètic, teixit adipós
AAV9	Humà	Galactosa N-unida, LamR	Fetge, SNC, retina, pàncrees, cor, múscul esquelètic, teixit adipós, ronyó, testicles, pulmó
AAVrh10	Macaco rhesus	LamR	Fetge, SNC, retina, pàncrees, cor, múscul esquelètic, ronyó, pulmó

PNH: Primats No Humans; HS: Heparan Sulfat; FGFR1: Receptor del Factor de Creixement dels Fibroblasts tipus 1; HGFR: Receptor del Factor de Creixement d'Hepatòcits; LamR: Receptor de la Laminina; PDGFR: Receptor del Factor de Creixement derivat de les Plaquetes; EGFR: Receptor del Factor de Creixement Epidèrmic. Adaptat de Lentz, 2012; Balakrishnan, 2014; i Lisowski, 2015.

A causa del seu perfil de seguretat i la seva expressió robusta a llarg termini, l'administració del vector AAV9 ha esdevingut una de les principals aproximacions per al tractament de diverses LSD, com les mucopolisacaridosis (*Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017*), la malaltia de Pompe (*Hordeaux, 2017*) o la malaltia de Niemann-Pick tipus A (*Samaranch, 2019*). Així doncs, la teràpia gènica basada en l'administració del vector AAV9 té el potencial d'esdevenir un tractament eficaç i curatiu per al tractament de la malaltia de NPC2.





### ***III. Objectius***



La Niemann-Pick tipus C2 és una malaltia minoritària que es caracteritza per una afectació severa i progressiva del SNC i una patologia dels teixits perifèrics comparativament més lleu. Clínicament, presenta un ampli espectre fenotípic, però la majoria dels pacients desenvolupen atàxia cerebel·losa, cataplexia, disàrtria, disfàgia i atacs epilèptics entre els 2 i els 15 anys d'edat i moren abans de la tercera dècada de vida. Els tractaments actuals aconsegueixen establir i alentir la progressió de la malaltia, però no són curatius i no resulten en un increment significatiu de l'esperança de vida. Així doncs, és necessari desenvolupar noves estratègies més eficaces per al tractament de la NPC2. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració de vectors adenoassociats suposa una alternativa terapèutica molt prometedora, ja que una única administració del producte terapèutic permet l'expressió del gen deficitari de forma eficient i a llarg termini, amb un perfil de seguretat excel·lent. En anterior aproximacions de teràpia gènica desenvolupades al nostre grup per al tractament de diverses LSD, un única administració al LCR de vectors AAV9 codificants per la proteïna deficitària van conduir a la correcció de les alteracions patològiques tant al SNC com als teixits perifèrics. Aquests estudis suggereixen que també podria ser eficaç per al tractament de la malaltia de NPC2.

Així doncs, l'*objectiu general* d'aquesta tesi va ser **desenvolupar una aproximació de teràpia gènica per al tractament de la malaltia de Niemann-Pick tipus C2**. Aquest objectiu principal es va subdividir en els següents *objectius específics*:

- 1. Caracteritzar els efectes de la deleció del gen *Npc2* a un nou ratolí model de la NPC2.**
- 2. Avaluat l'eficàcia terapèutica de l'administració intra-LCR d'un vector adenoassociat de serotip 9 codificant per la proteïna NPC2 murina al ratolí model de la NPC2.**



## ***IV. Resultats***

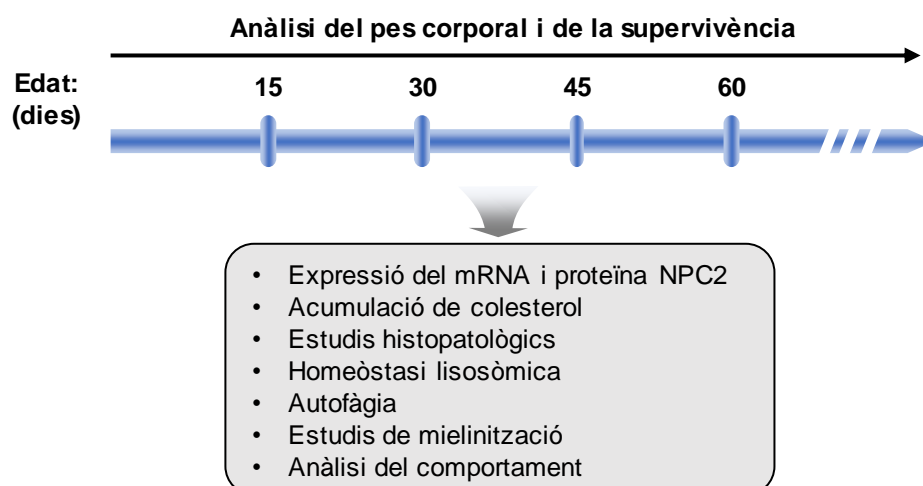




***Part 1. Caracterització del model murí de la NPC2***



A la primera part d'aquesta tesi es va caracteritzar un nou model de ratolí de la NPC2 obtingut a través del consorci internacional *IMPC* (*International Mouse Phenotyping Consortium*) s'havia generat mitjançant la substitució de l'exó 3 del gen *Npc2* per la casset d'expressió del gen *LacZ* en ratolins de fons genètic C57BL/6N, que va resultar en la disrupció del gen *Npc2* (Materials i mètodes, Figura 66). Com que era un nou model per la NPC2, es va dur a terme una caracterització fenotípica dels ratolins d'ambdós sexes a l'edat de 15, 30, 45 i 60 dies (Figura 10). Es va estudiar els efectes de la deleció del gen *Npc2* al SNC i als teixits perifèrics mitjançant l'anàlisi de diversos paràmetres bioquímics, es van realitzar estudis es va determinar l'homeòstasi del lisosoma i alguns processos que en depenen com la distensió lisosòmica, la desregulació enzimàtica o l'autofàgia, i els estudis de mielinització. A més a més, també es va avaluar el comportament i es va realitzar un estudi longitudinal del pes corporal i de la supervivència (Figura 10).



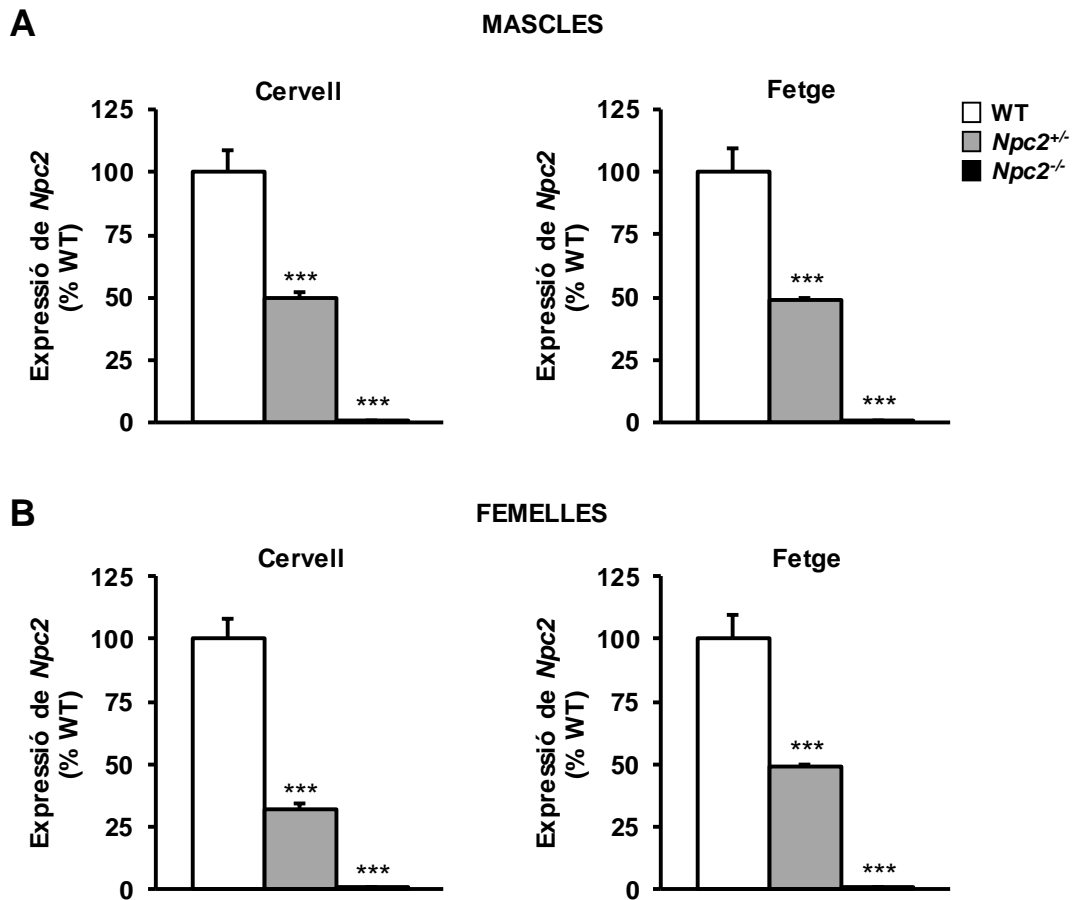
**Figura 10. Disseny experimental de l'estudi fenotípic del model murí de la NPC2.** L'estudi es va realitzar en animals d'ambdós sexes, mascles i femelles, a diverses edats.

## 1. CARACTERITZACIÓ GENERAL DEL RATOLÍ MODEL DE LA NPC2

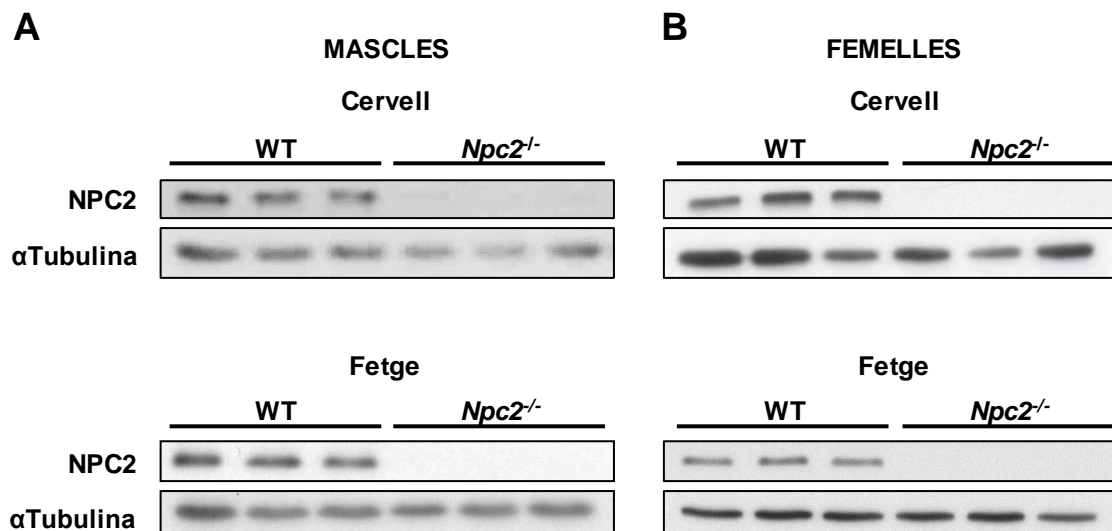
### 1.1. Expressió del mRNA i de la proteïna NPC2

Per tal de verificar que la mutació generada al gen *Npc2* resultava en un model KO, es van analitzar els nivells de mRNA i de proteïna NPC2 a l'encèfal i al fetge de ratolins WT, heterozigots i homozigots per la mutació del gen de la *Npc2* als 60 dies

d'edat. Els nivells de mRNA de la *Npc2* a les mostres de cervell i fetge d'animals heterozigots *Npc2*<sup>+/-</sup> presentaven una reducció d'aproximadament el 50% respecte els nivells d'expressió observats als animals WT, mentre que eren pràcticament indetectables (<0.5%) als animals homozigots *Npc2*<sup>-/-</sup>, tant en mascles (Figura 11A) com en femelles (Figura 11B). En conseqüència, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> d'ambdós sexes tampoc presentaven nivells detectables de la proteïna NPC2 ni al fetge ni al cervell (Figura 12).



**Figura 11. Expressió del gen *Npc2* al ratolí model de la NPC2. (A,B)** Estudi de l'expressió del gen *Npc2* per qPCR a les mostres de cervell i fetge de ratolins WT, heterozigots (*Npc2*<sup>+/-</sup>) i homozigots (*Npc2*<sup>-/-</sup>) mascles (A) i femelles (B) als 60 dies d'edat. Les dades es mostren com a la mitjana ± SEM de 4 animals per grup. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.



**Figura 12. Expressió de la proteïna NPC2 al ratolí model de la NPC2.** Estudi dels nivells d'expressió de la proteïna NPC2 mitjançant el *Western blot* a les mostres de cervell i fetge de ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles (A) i femelles (B) als 60 dies d'edat. L'αTubulina es va utilitzar com a control de càrrega. Resultats de 3 animals per grup.

## 1.2. Anàlisi de les proporcions genotípiques

Es va estudiar la ràtio dels diferents genotips de la descendència dels creuaments d'animals heterozigots. Les proporcions dels genotips de la descendència a l'edat del deslletament (3 setmanes) eren sub-mendelianes (Taula 4). El percentatge de cries esperat era del 25% WT, 50% heterozigots i 25% homozigots. En canvi, els percentatges d'homozigots observats eren significativament inferiors: un 19.75% d'homozigots mascles i un 18.58% femelles (Taula 4). Aquests resultats indicaven que hi havia letalitat embrionària o perinatal.

**Taula 4. Proporció dels genotips de les cries de creuaments heterozigots a l'edat de deslletament.**

Sexe	WT ( <i>Npc2</i> <sup>+/+</sup> ) (%)	Heteozigots ( <i>Npc2</i> <sup>+/-</sup> ) (%)	Homozigots ( <i>Npc2</i> <sup>-/-</sup> ) (%)	Valor <i>p</i> <sup>1</sup>
Mascles	304 (25.53%)	663 (55.02%)	238 (19.75%)	<i>p</i> <0.001
Femelles	326 (27.65%)	634 (53.77%)	219 (18.58%)	<i>p</i> <0.001

<sup>1</sup> Respecte la ratio esperada de WT (*Npc2*<sup>+/+</sup>), Heterozigots (*Npc2*<sup>+/-</sup>) i Homozigots (*Npc2*<sup>-/-</sup>) (1:2:1).

### 1.3. Pes corporal

Una de les conseqüències més evidents de la deleció del gen *Npc2* va ser el seu efecte en el desenvolupament i el creixement dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>. Mentre que els animals WT van presentar un creixement progressiu, es va observar un retràs del creixement dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles i femelles (Figura 13). A partir de les 6 setmanes d'edat, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> presentaven un pes corporal significativament inferior als animals WT, amb un pic de pes entorn a les 7 setmanes, moment a partir del qual van començar a perdre pes de forma progressiva fins a la setmana 13, l'edat de mort.

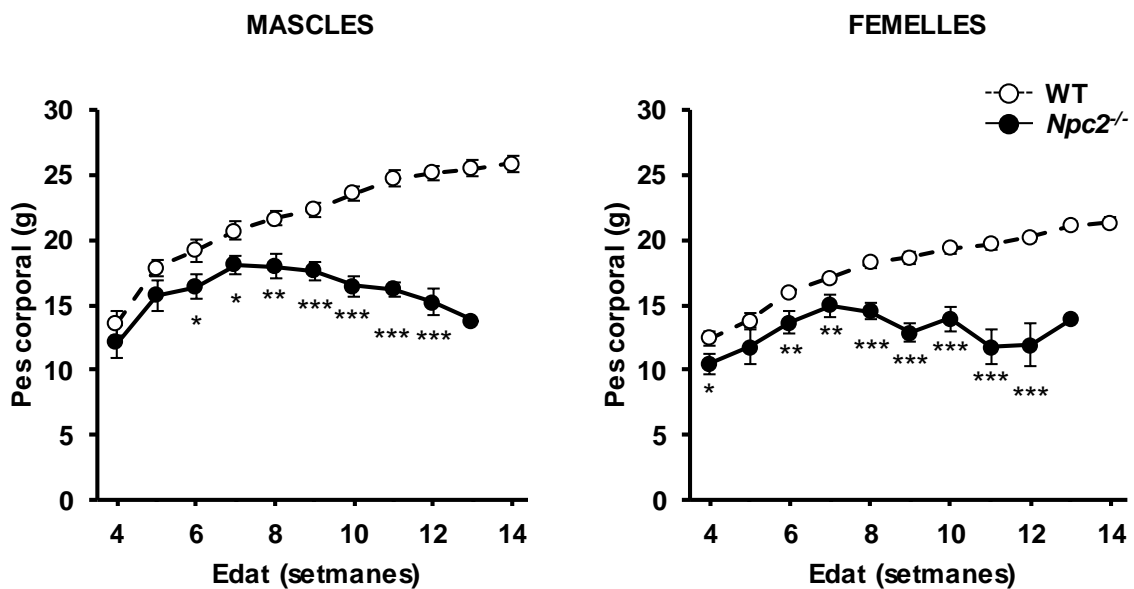
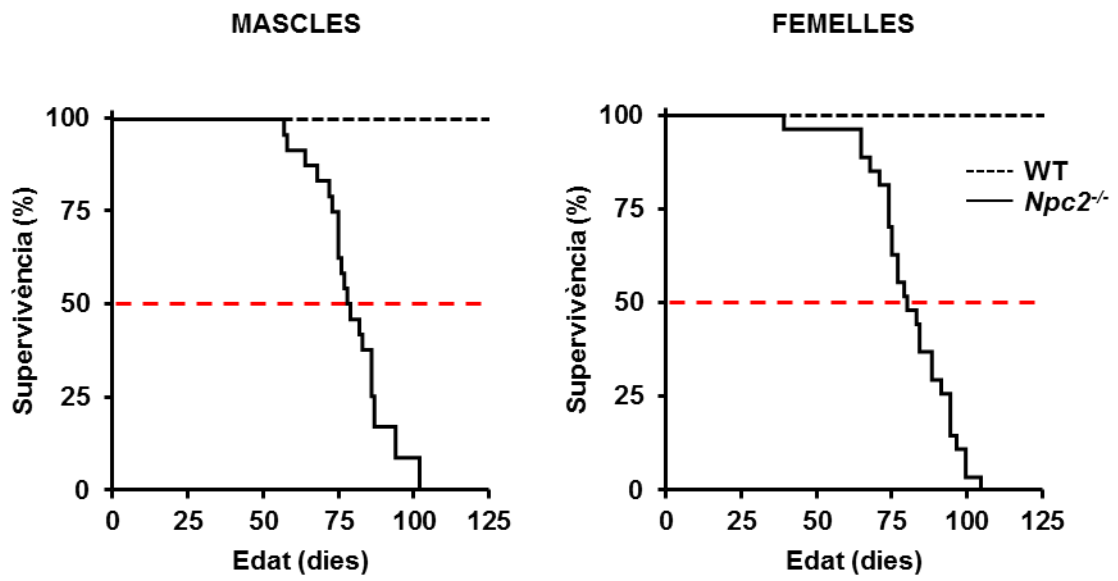


Figura 13. Efecte de la deleció del gen *Npc2* al pes corporal del ratolí model de la NPC2. Estudi del pes corporal en ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles i femelles. Les dades es mostren com a la mitjana ± SEM de 7-12 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

### 1.4. Supervivència

Paral·lelament a l'estudi del seguiment del pes corporal, també es va realitzar una anàlisi de la supervivència. Els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar una reducció dràstica de la supervivència, de forma molt similar tant en mascles com en femelles (Figura 14). La majoria dels animals homozigots van morir entre els 60 i 100 dies d'edat i la mediana de supervivència va ser de 78.5 dies en mascles i de 78 dies en femelles.



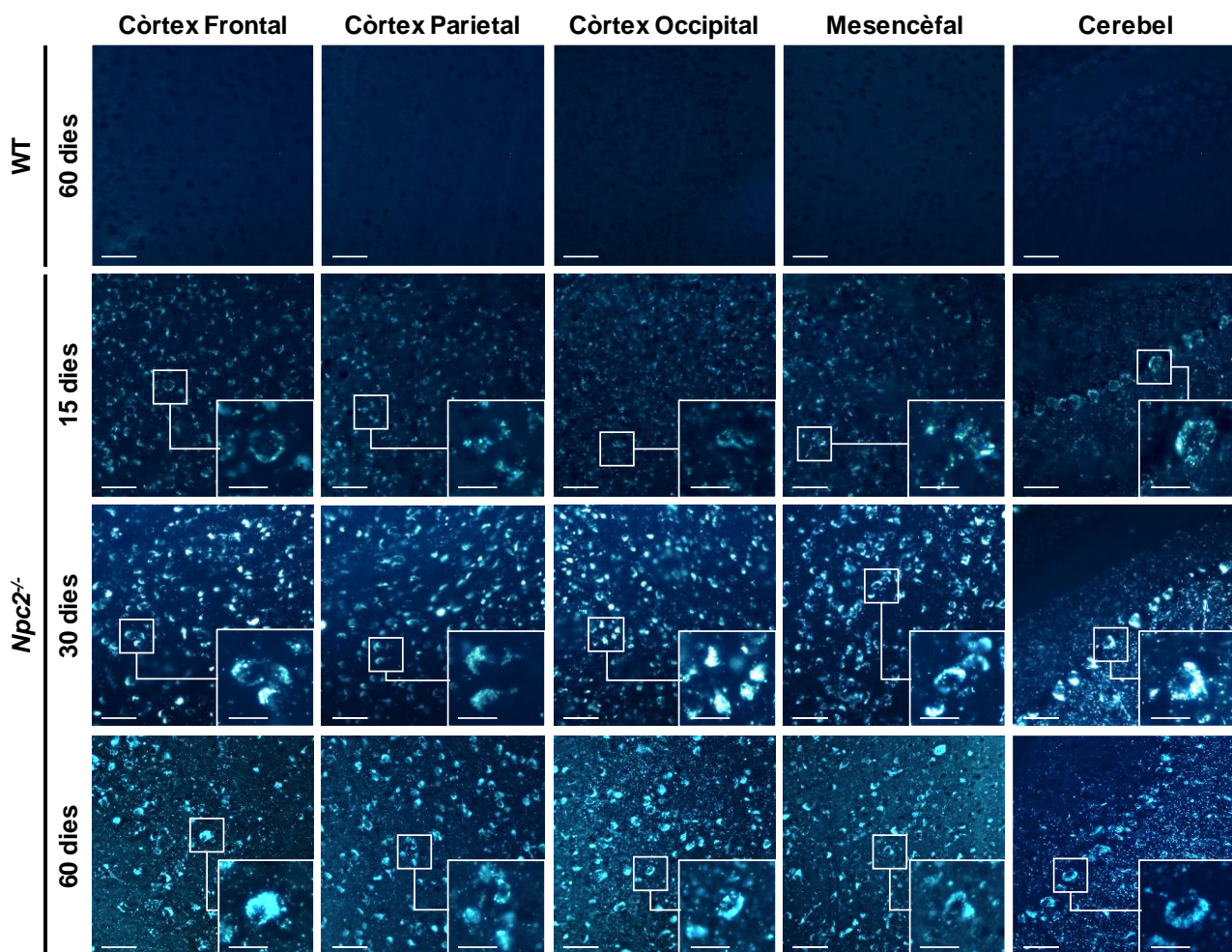
**Figura 14. Estudi de la supervivència dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>.** Representació de Kaplan-Meier de les corbes de supervivència dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> d'ambdós sexes. Dades de 26-27 animals per grup.



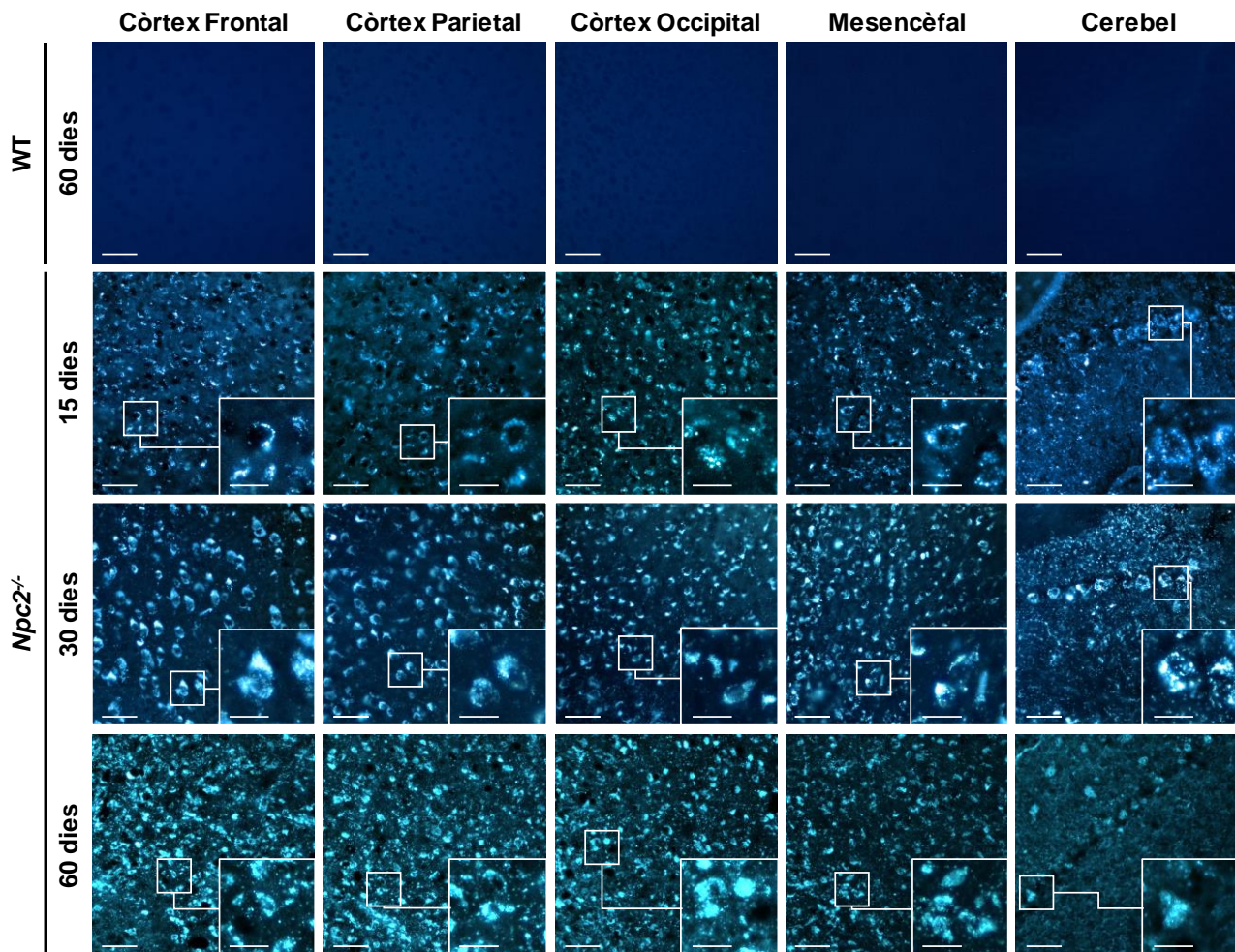
## 2. ESTUDI DE LA PATOLOGIA AL SNC

### 2.1. Acumulació de colesterol

La deficiència de la NPC2 en humans provoca, principalment, l'acumulació de colesterol no esterificat als lisosomes (*Vanier, 2010*). Per tant, es va avaluar l'acumulació de colesterol al model murí de la NPC2 a les edats de 15, 30 i 60 dies mitjançant l'anàlisi histològic de les seccions de l'encèfal amb la tinció de filipina, una molècula fluorescent que s'uneix específicament al colesterol no esterificat. A diferència dels ratolins WT, que no presentaven marcatge positiu per la filipina a cap de les edats estudiades, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>, mascles i femelles, presentaven una acumulació de colesterol no esterificat generalitzada a tot l'encèfal ja present als 15 dies d'edat i que va augmentar progressivament amb l'edat (Figura 15 i Figura 16). Segons la morfologia del marcatge, aquesta acumulació es localitzava principalment als somes neuronals.



**Figura 15. Acumulació de colesterol no esterificat a l'encèfal dels ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup>.** Imatges representatives de la tinció de filipina per a detectar el colesterol no esterificat a diverses regions de l'encèfal dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a 15, 30 i 60 dies d'edat. Imatges representatives de 4-5 animals per grup. Barra d'escala: 50 µm (20 µm a l'ampliació).



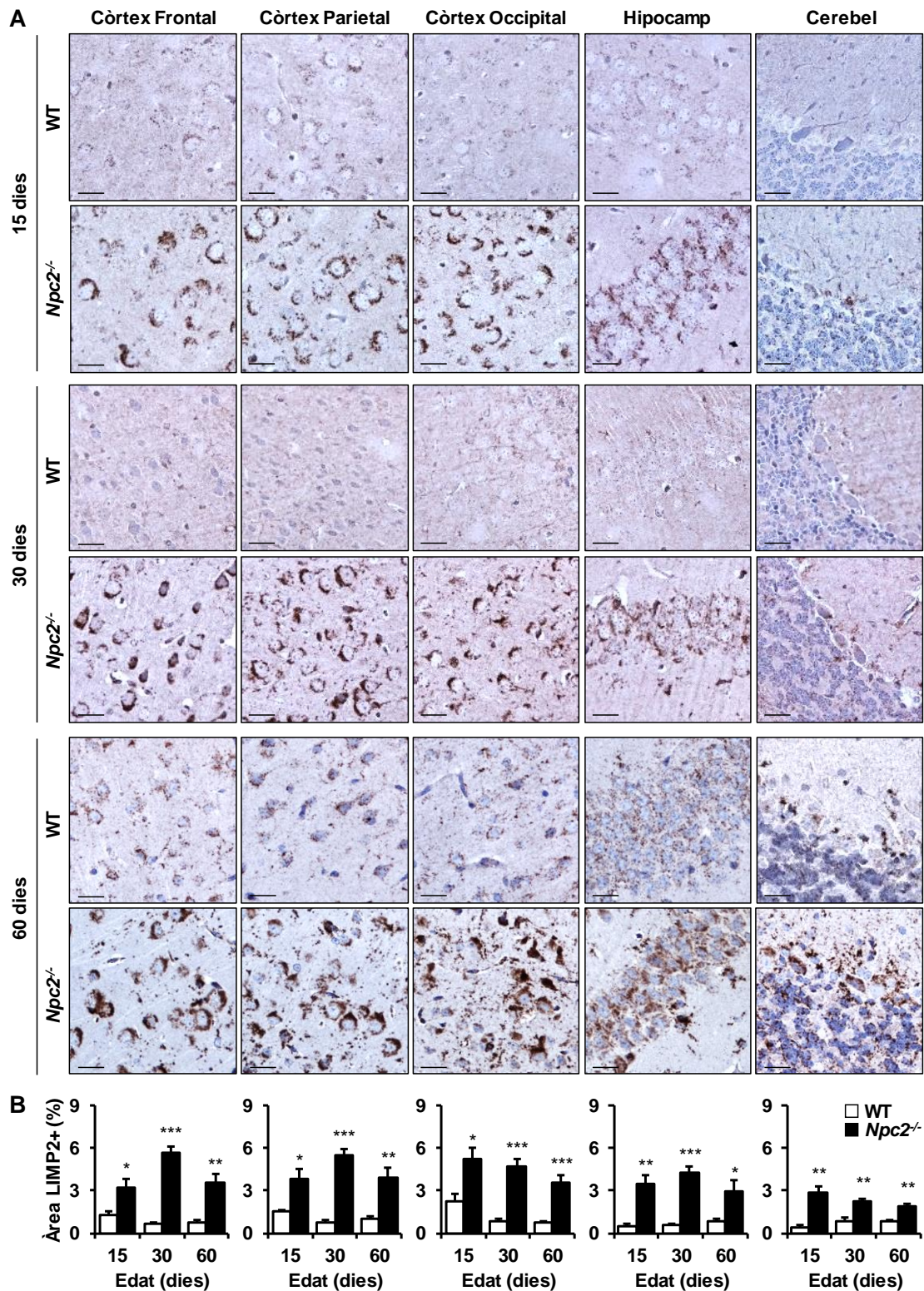
**Figura 16. Acumulació de colesterol a l'encèfal dels ratolins femelles *Npc2*<sup>-/-</sup>.** Imatges representatives de la tinció de filipina per a detectar el colesterol no esterificat a diverses regions de l'encèfal dels ratolins femelles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a 15, 30 i 60 dies d'edat. Imatges representatives de 3-5 animals per grup. Barra d'escala: 50 µm (20 µm a l'ampliació).

## 2.2. Homeòstasi lisosòmica

### 2.2.1. Distensió lisosòmica

A les LSD, l'acumulació de diverses molècules no degradades als lisosomes resulta en un augment del nombre i/o la mida d'aquests orgànuls, anomenada distensió lisosòmica (Hůlková, 2012; Rowan, 2013; Motas, 2016). La distensió lisosòmica observada en el model murí de la NPC2 es va avaluar als 15, 30 i 60 dies d'edat mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna LIMP2, un marcador de la distensió lisosòmica. Als ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup> es va observar un augment estadísticament significatiu de la intensitat del senyal de LIMP2 en comparació amb els animals WT, que ja era evident als 15 dies d'edat i es va mantenir elevada a la resta d'edats analitzades (Figura 17).





**Figura 17. Distensió del compartiment lisosòmic a l'encèfal dels ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup>.** La mida del compartiment lisosòmic es va analitzar a diverses regions de l'encèfal mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica amb el marcador lisosòmic LIMP2 a 15, 30 i 60 dies d'edat. **(A)** Imatges representatives obtingudes de diverses regions de l'encèfal dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup>. Barra d'escala: 25 µm. **(B)** Quantificació del percentatge d'àrea positiva de LIMP2 de cada regió analitzada. Les dades es mostren com a la mitjana ± SEM de 5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

Aquests resultats suggerien que una acumulació de colesterol no esterificat al SNC provocava un augment de la mida i/o nombre de lisosomes a totes les regions analitzades, que evidenciava la distensió lisosòmica al SNC del ratolí model de la NPC2.

### 2.2.2. Desregulació enzimàtica

En moltes LSD, la deficiència de la proteïna que causa la malaltia, així com l'acumulació de substrats al lisosoma, condueixen de manera secundària a l'alteració d'altres proteïnes lisosòmiques (Haurigot, 2013; Ribera, 2015). Un exemple són les hidrolases, uns enzims lisosòmics que participen en la degradació dels substrats que són incorporats a dins del lisosoma per a ser reciclats (Sardiello, 2009; Rowan, 2013). Per a determinar si l'homeòstasi lisosòmica estava compromesa a causa de la deleció del gen *Npc2*, es va avaluar l'activitat enzimàtica de diversos enzims lisosòmics als extractes proteics de l'encèfal de ratolins mascles i femelles. L'activitat dels enzims  $\beta$ -hexosaminidasa ( $\beta$ -HEXO) i Heparà  $\alpha$ -glucosaminida N-acetiltransferasa (HGSNAT), un enzim soluble i un enzim de membrana, respectivament, mostraven un increment de la seva activitat enzimàtica que ja era evident als 15 dies d'edat i augmentava progressivament amb l'edat (Figura 18). Aquests resultats indicaven que hi havia una pertorbació evident de l'homeòstasi lisosòmica al model murí de la NPC2.

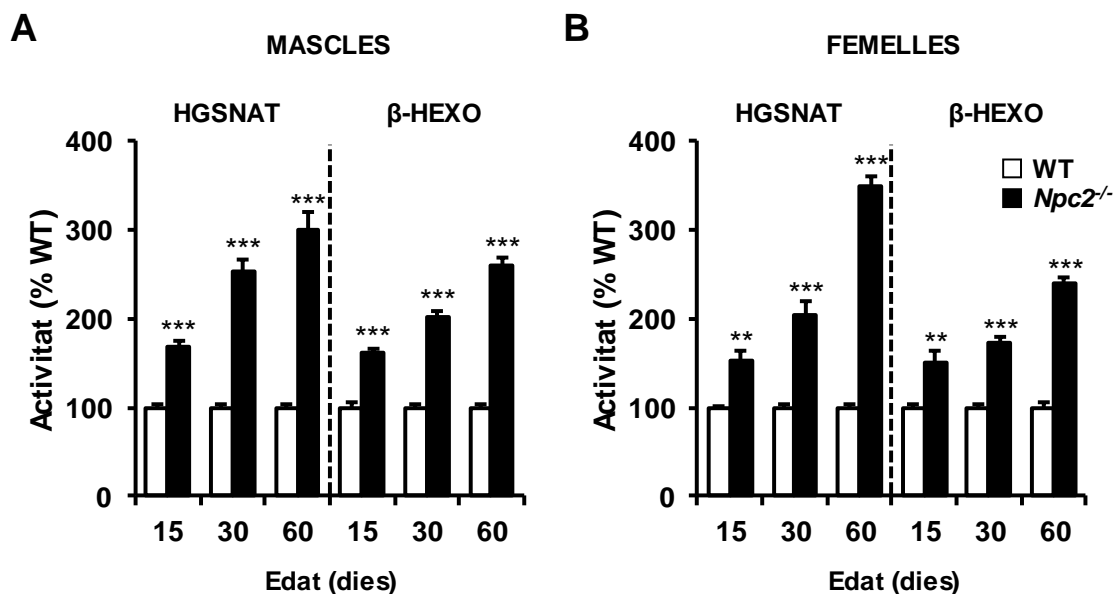
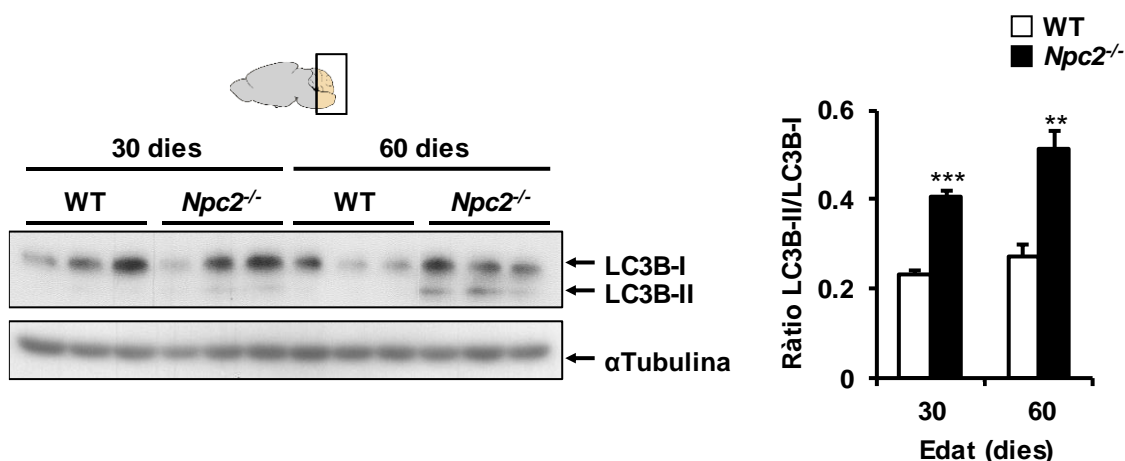


Figura 18. Alteració de l'homeòstasi del lisosoma a l'encèfal de ratolins mascles i femelles *Npc2*<sup>-/-</sup>. (A,B) Determinació de l'activitat dels enzims lisosòmics  $\beta$ -HEXO i HGSNAT als extractes proteics de cervell d'animals mascles (A) i femelles (B) WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a l'edat de 15, 30 i 60 dies. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

### 2.2.3. Defectes de l'autofàgia

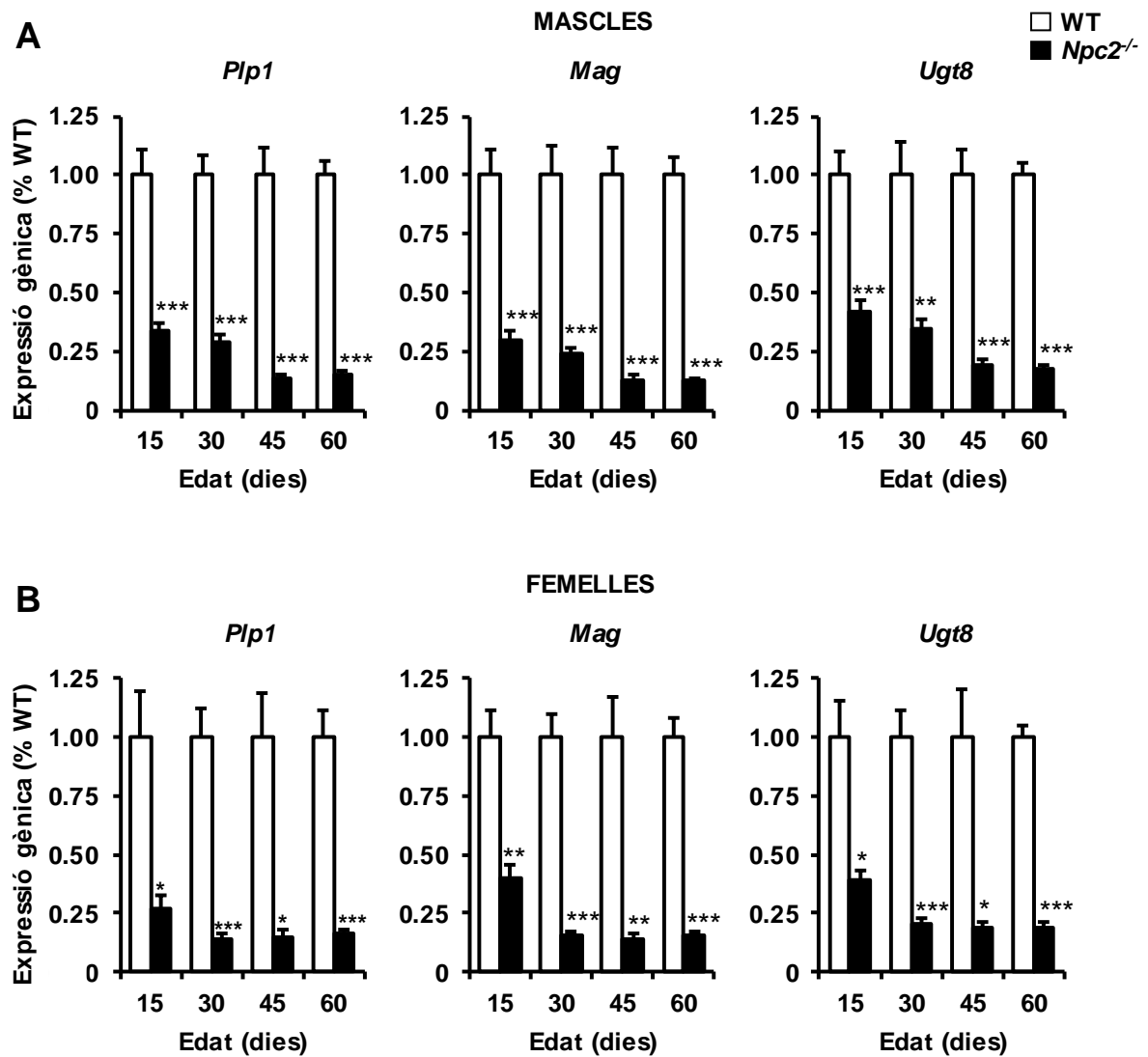
El lisosoma és un orgànul involucrat en els processos d'autofàgia. Alguns estudis demostren que la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica a les LSDs inclou alteracions del flux autofàgic de la cèl·lula. Per a determinar si l'autofàgia també estava alterada al nostre model murí de la NPC2, es va dur a terme una anàlisi per *Western blot* per a detectar la cadena lleugera 3B de la proteïna associada als microtúbuls 1A/1B (LC3B, *Microtubule-associated protein 1A/1B light chain 3B*) com a marcador de l'alteració del flux autofàgic. La LC3B és una proteïna de la família de les ATG8 que participa en la biogènesis dels fagosomes i la selecció de substrats per a ser degradats. Existeix com a una proteïna citosòlica (LC3B-I) que es modifica a causa de la unió covalent a un lípid quan interacciona amb la membrana del fagosoma (LC3B-II). Així doncs, una acumulació de la forma LC3B-II indica un increment de la formació de fagosomes o una reducció del flux autofàgic (*Koukourakis, 2015*). Aleshores, es va avaluar el flux autofàgic als extractes proteics de la regió caudal de l'encèfal de ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a l'edat de 30 i 60 dies. Als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> es va observar un augment significatiu i progressiu de la ràtio LC3B-II/LC3B-I (Figura 19) a la regió més caudal on es troba el cerebel, una de les regions més afectades de l'encèfal als pacients amb NPC2 (*Malik, 2019*). Aquests resultats indicaven que el flux autofàgic estava alterat al model murí de la NPC2.



**Figura 19. Determinació de les alteracions del flux autofàgic a l'encèfal.** El flux autofàgic es va avaluar per *Western blot* a les regions caudal de l'encèfal dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a les edats de 30 i 60 dies. Anàlisi per *Western blot* de la quantitat de proteïna LC3B-I i LC3B-II amb les seves respectives quantificacions de la ràtio LC3B-II/LC3B-I. L' $\alpha$ Tubulina es mostra com a control de càrrega. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 3 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

### 2.3. Desmielinització

Els defectes de la mielinització són força habituals a les LSD neurodegeneratives on el metabòlit d'acumulació primària són lípids, com ara la GM2-gangliosidosi o la malaltia de Krabbe (Di Rocco, 2005; Cachón-González, 2014). Als models animals de la NPC1 s'hi han observat defectes en la maduració dels oligodendròcits i la síntesi de la mielina (Yang, 2018). Els oligodendròcits són les cèl·lules que s'encarreguen del procés de mielinització al SNC (Bradl, 2010; Simons, 2016). Per a determinar si el ratolí model de la NPC2 presentava una alteració de la maduració dels oligodendròcits i/o del procés de mielinització, es van quantificar els nivells d'expressió de diversos gens clau que codifiquen per components essencials de la mielina o bé proteïnes involucrades en el procés de mielinització, com ara la proteïna proteolipina 1 (PLP1, *Proteolipin protein 1*; Gen: *Plp1*), la glicoproteïna associada a la mielina (MAG, *Myelin-associated glycoprotein*; Gen: *Mag*) i la 2-hidroxiacilesfingosina 1- $\beta$ -galactosiltransferasa (GalCerS, *2-hydroxyacylsphingosin 1-beta-galactosyltransferase*; Gen: *Ugt8*). La PLP1 és la proteïna més abundant de la mielina i, al igual que la MAG, són proteïnes estructurals de la mielina (Werner, 2013). A part del fet que el colesterol és també un component de la mielina *per se*, la PLP1 conté un domini d'unió al colesterol necessari per a la seva incorporació a les beines, fet que vincula el metabolisme del colesterol directament amb la mielinització (Saher, 2012). La GalCerS participa en la síntesi dels sulfàtids, uns glicoesfingolípids essencials per la funció i l'estructura de la mielina (Eckhardt, 2008; Dzięgiel, 2010). La quantificació de l'expressió d'aquests gens per qPCR a les mostres de cervell de ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles i femelles entre els 15 i els 60 dies d'edat va evidenciar una reducció molt dràstica de la mielinització als animals *Npc2*<sup>-/-</sup> (Figura 20A i B). Als 15 dies d'edat, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> presentaven uns valors d'expressió d'aquests gens inferiors al 40% respecte els valors dels animals WT. Progressivament, els nivells de mRNA van anar disminuint fins a arribar a menys del 25% als 60 dies d'edat. Aquests resultats indicaven que els ratolins NPC2 presentaven una reducció de la maduració dels oligodendròcits i/o una hipomielinització a l'encèfal que ja era evident als 15 dies d'edat i s'agreujava progressivament amb el temps.



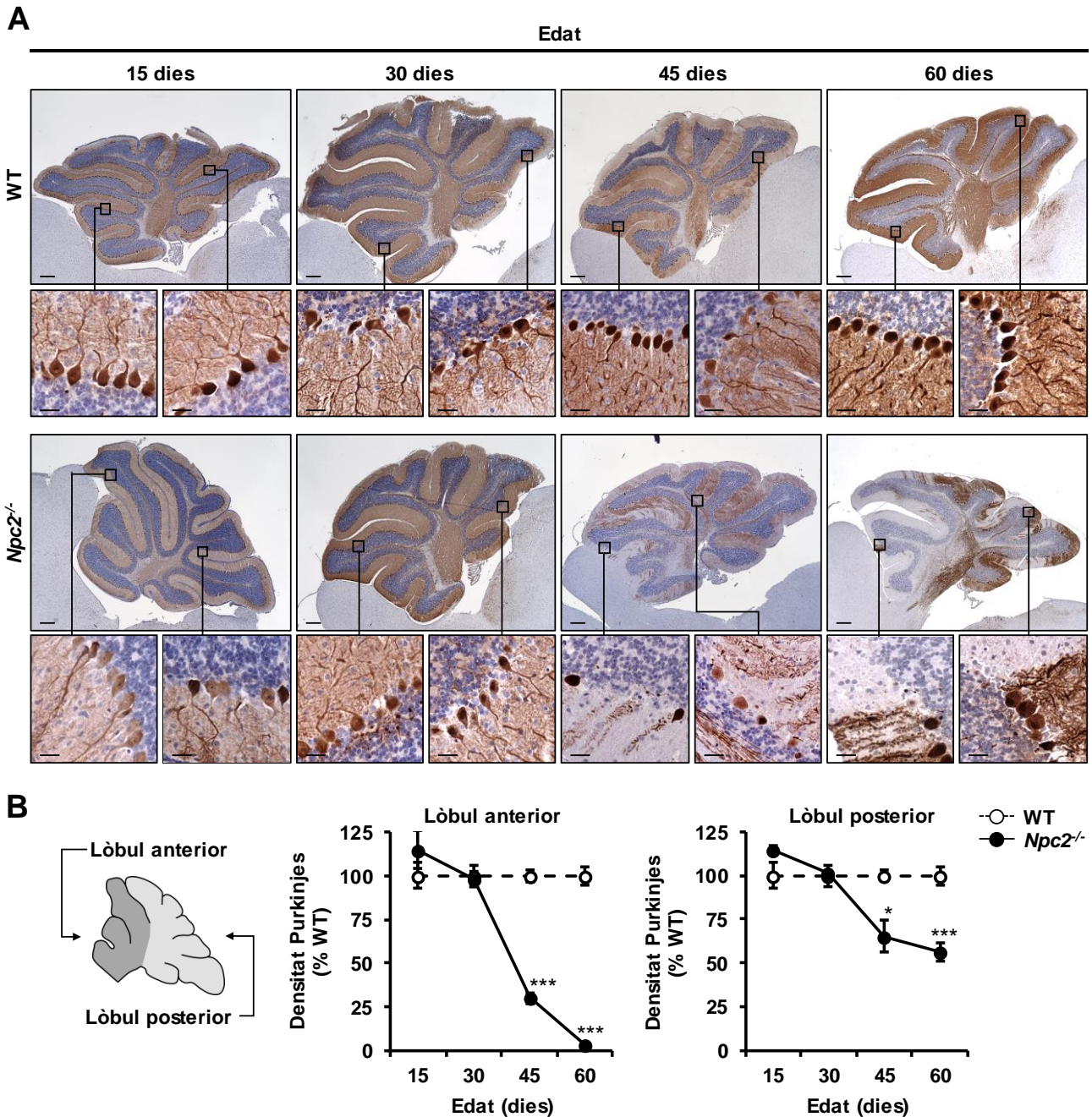
**Figura 20. Reducció de l'expressió de components de la mielina involucrats en el procés de mielinització al cervell. (A,B)** Quantificació per qPCR dels nivells d'expressió dels gens *Plp1*, *Mag* i *Ugt8*, components estructurals o involucrats en el procés de mielinització, a les mostres d'encèfal dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles (A) i femelles (B) entre els 15 i 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 3-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

#### 2.4. Patologia del cerebel

Una de les característiques més rellevants de la malaltia de NPC2 és l'atàxia cerebel·losa, un símptoma produït per la disfunció o la mort de les cèl·lules de Purkinje (Mengel, 2013). Per tal de caracteritzar la patologia al cerebel del ratolí model de la NPC2, es va realitzar una quantificació de les cèl·lules de Purkinje als talls histològics mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra la Calbindina D28k, un marcador de les cèl·lules de Purkinje. Fins als 30 dies d'edat, la densitat de cèl·lules de Purkinje als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> era indistingible de la dels ratolins WT (Figura 21). En canvi, entre els 30 i els 60 dies d'edat, hi va haver una caiguda progressiva i molt significativa de la densitat



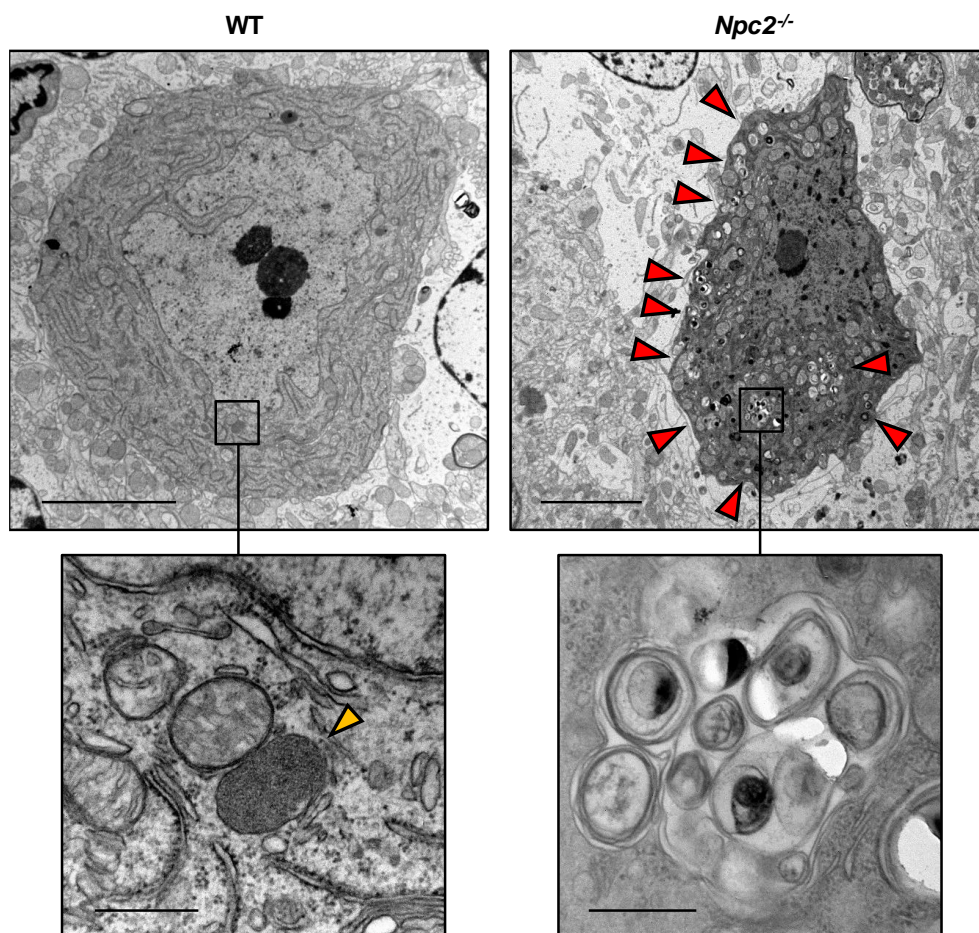
de les cèl·lules de Purkinje. Als 60 dies d'edat, aquesta densitat al lòbul anterior era únicament del 3% respecte els animals WT, mentre que al lòbul posterior, tot i que també era estadísticament significativa, la baixada de la densitat de cèl·lules de Purkinje va ser més moderada i es va situar al voltant del 55% del valor dels animals WT (Figura 21).



**Figura 21. Anàlisi de les cèl·lules de Purkinje al cerebel de ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles. (A)** Imatges representatives de la immunohistoquímica contra el marcador Calbindina D28k, un marcador de les cèl·lules de Purkinje, a les seccions de cerebel de ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a les edats de 15, 30, 45 i 60 dies. Barra d'escala: 500 µm (25 µm a l'ampliació). **(B)** Comptatge de cèl·lules de Purkinje per longitud del perímetre a cada lòbul del cerebel. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 3-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT. A l'esquema es mostra el lòbul anterior del cerebel en gris fosc i el lòbul posterior en gris clar.



Per altra banda, es va realitzar un estudi de la ultraestructura de les cèl·lules de Purkinje als 60 dies d'edat mitjançant la microscòpia electrònica de transmissió (MET). L'anàlisi ultraestructural va evidenciar que les poques cèl·lules de Purkinje que es van poder detectar als ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup> tenien una gran acumulació de vesícules amb morfologia típica d'autofagosoma plenes de material electrodens i estructures multilamel·lars concèntriques (Figura 22). En canvi, les cèl·lules de Purkinje dels animals WT, molt més abundants, només presentaven alguns lisosomes secundaris d'aspecte totalment normal (Figura 22). L'increment de vesícules plenes de material no degradat detectades a l'anàlisi ultraestructural correlacionava amb l'increment del marcatge amb LIMP2 (Figura 17) i amb la reducció del flux autofàgic (Figura 19) observada al cerebel. Així doncs, aquests resultats indicaven que les cèl·lules de Purkinje es trobaven molt alterades al model murí de la NPC2.



**Figura 22. Anàlisi ultraestructural de les cèl·lules de Purkinje al model murí de la NPC2.** Anàlisi per MET de les cèl·lules de Purkinje als 60 dies d'edat dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> on s'observa l'acumulació de vesícules plenes de material electro-dens i estructures multilamel·lars, marcades amb fletxes vermelles. La fletxa taronja indica un lisosoma secundari. Imatges representatives de 2 animals per grup. Barra d'escala: 5 µm (500 nm a l'ampliació).

## 2.5. Neuroinflamació

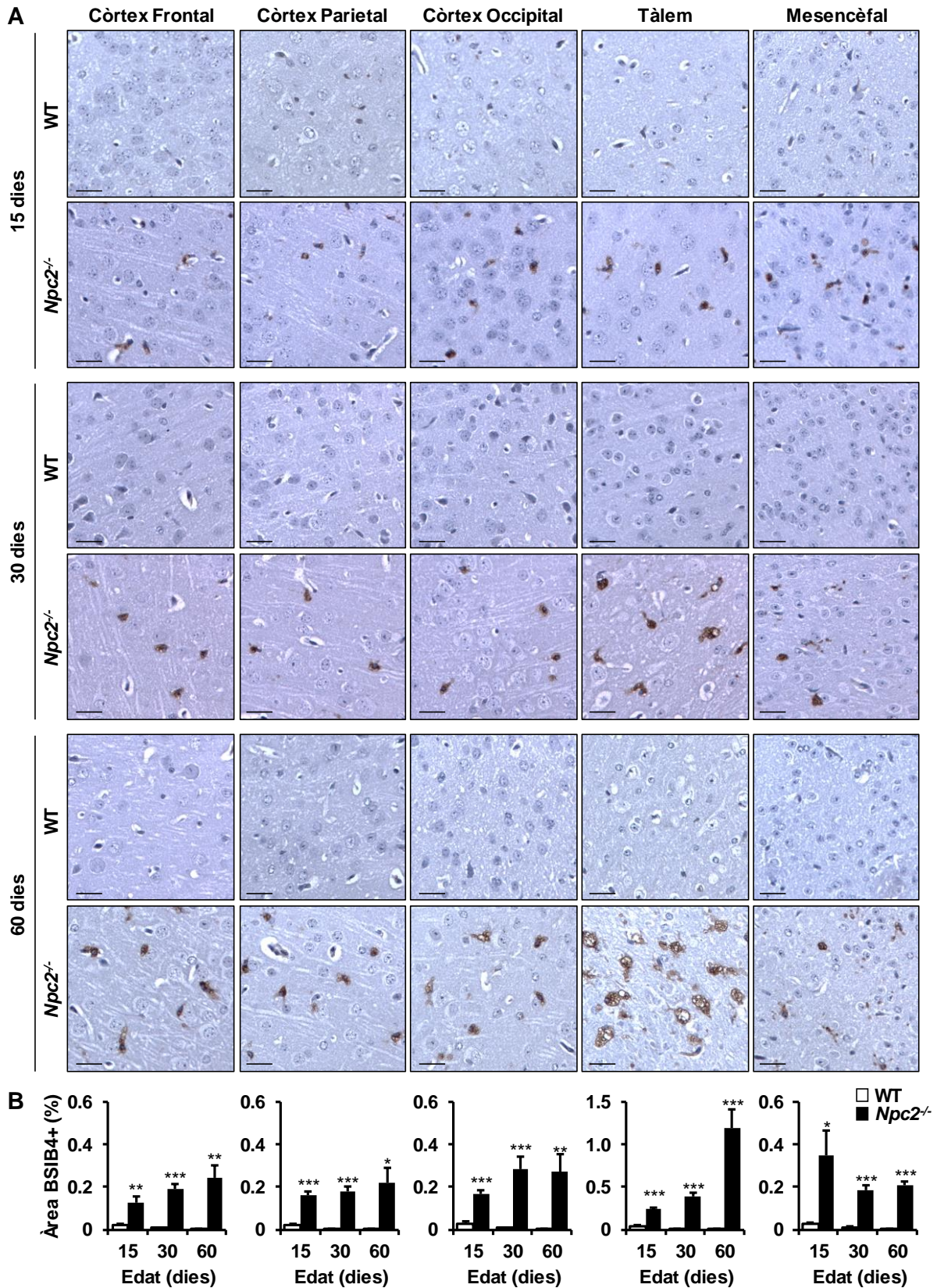
La micròglia i els astròcits són dos tipus cel·lulars que participen en l'homeòstasi del cervell. La micròglia són els macròfags residents del SNC i tenen funcions immunològiques i de poda sinàptica; mentre que els astròcits tenen funcions de suport metabòlic a les neurones i també intervenen en la modulació sinàptica. Com a resposta a diversos processos patològics a l'encèfal, es produeix l'activació d'aquests dos tipus cel·lulars que dona lloc al que es coneix com a microgliosi i astrocitosi, és a dir, la neuroinflamació al SNC (*German, 2002; Platt, 2016; Bräuer, 2019*). Es va a dur a terme un estudi en animals mascles del model de la NPC2 a l'edat de 15, 30 i 60 dies per a detectar la neuroinflamació mitjançant l'anàlisi immunohistoquímica contra la proteïna àcida fibril·lar glial (GFAP, *Glial Fibrillary Acidic Protein*), una proteïna sobreexpressada en astròcits activats; i la lectina BSIB4, la qual reconeix els residus terminals d' $\alpha$ -D-galactosa de conjugats glicoproteics presents a la membrana cel·lular de la micròglia, que marca preferentment la micròglia activada (*Ruzo, 2012a; Jang, 2013; Ribera, 2015*).

A partir dels 15 dies d'edat, es va observar un increment significatiu del senyal de BSIB4 a totes les regions de l'encèfal estudiades de ratolins mascles *Npc2<sup>-/-</sup>* que va augmentar progressivament als 30 i 60 dies d'edat, mentre que el marcatge era absent als ratolins WT (Figura 23).

De forma similar, també es va observar un increment del marcatge per a GFAP als ratolins mascles *Npc2<sup>-/-</sup>* comparat amb els animals WT, que presentaven un marcatge molt menor i sense cap aspecte patològic (Figura 24). L'increment de la intensitat de senyal va ser evident a partir dels 15 dies d'edat al còrtex frontal, parietal i occipital, al tàlem i al mesencèfal, que va augmentar progressivament fins als 60 dies d'edat.

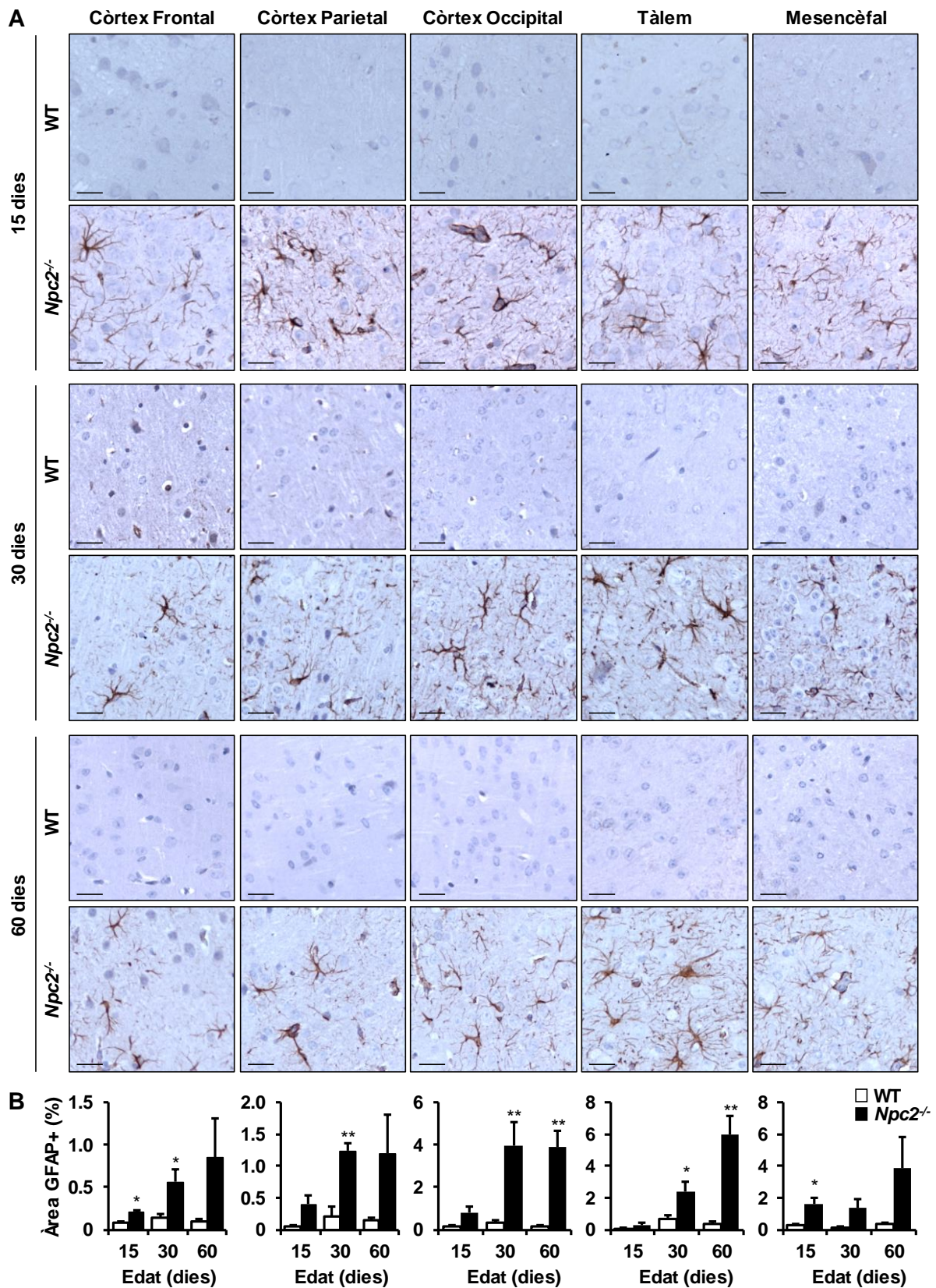
Així doncs, l'increment del marcatge per a BSIB4 i GFAP indicava la presència de neuroinflamació en forma d'astrocitosi i microgliosi generalitzada a tot l'encèfal dels ratolins *Npc2<sup>-/-</sup>* a partir dels 15 dies d'edat.





**Figura 23. Caracterització de la microgliosi a l'encèfal dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles. (A)** Imatges representatives de la tinció amb la lectina BSIB4 a diverses regions de l'encèfal dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup>. Barra d'escala: 25 µm. **(B)** Histogrames amb la quantificació de l'àrea positiva d'aquestes regions. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.



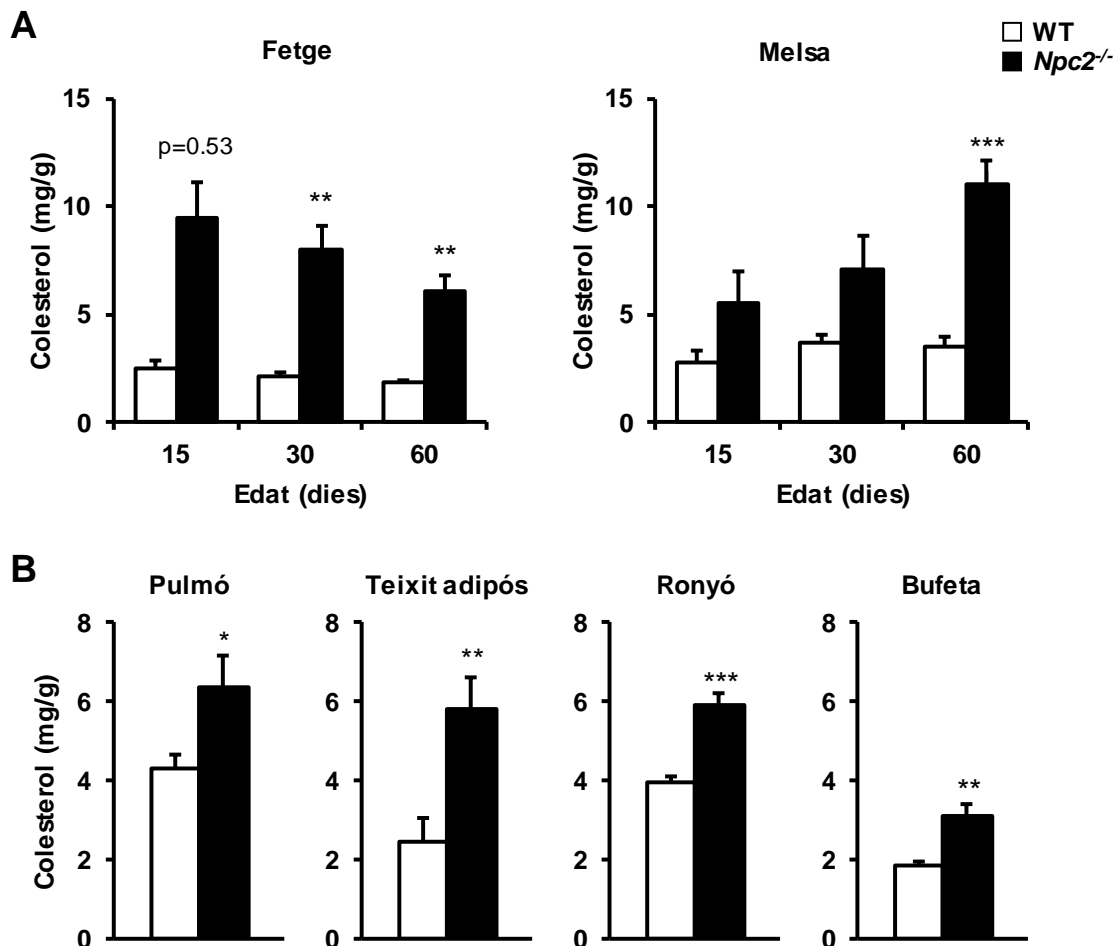


**Figura 24. Caracterització de l'astrocitosi a l'encèfal dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles. (A)** Imatges representatives de la immunohistoquímica contra el marcador GFAP a diverses regions de l'encèfal dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup>. Barra d'escala: 25 µm. **(B)** Histogrames de la quantificació de l'àrea positiva d'aquestes regions. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. WT.

### 3. ESTUDI DE LA PATOLOGIA ALS TEIXITS PERIFÈRICS DEL RATOLÍ MODEL DE LA NPC2

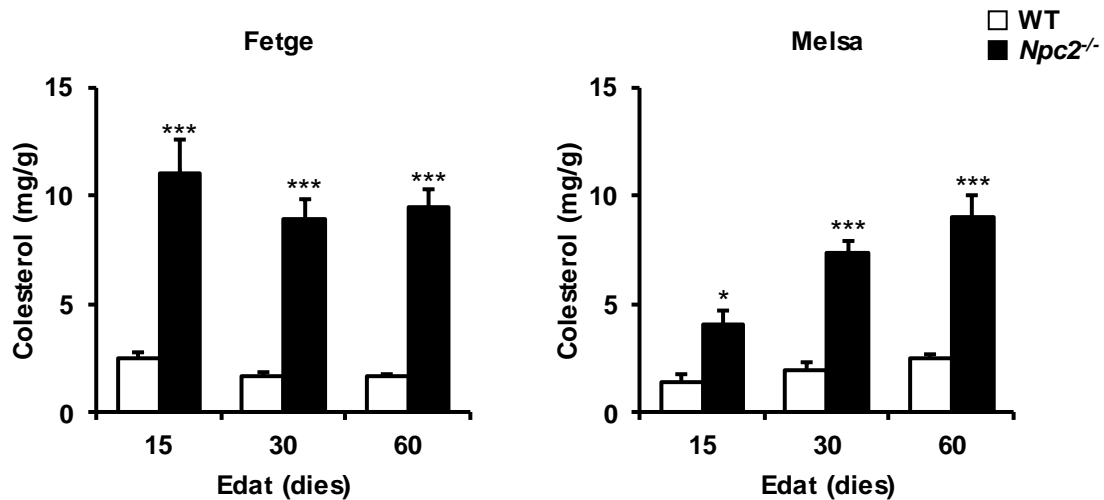
#### 3.1. Acumulació de colesterol

Per a determinar si la deficiència de la proteïna NPC2 també resultava en l'acumulació de colesterol als teixits somàtics, es va dur a terme l'extracció de lípids on s'hi va quantificar el colesterol total. La determinació es va realitzar a les edats de 15, 30 i 60 dies a les mostres del fetge i la melsa; i a les mostres del pulmó, el teixit adipós blanc inguinal, el ronyó i la bufeta als 60 dies d'edat. Als mascles *Npc2*<sup>-/-</sup>, es va detectar un augment del contingut de colesterol total al fetge a totes les edats analitzades, mentre que a la melsa s'hi va observar una tendència que no va ser estadísticament significativa fins als 60 dies d'edat (Figura 25A). A la resta de teixits analitzats, també es va detectar un augment estadísticament significatiu del contingut de colesterol total (Figura 25B).



**Figura 25. Determinació del contingut de colesterol als teixits somàtics de ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles.** (A,B) Quantificació del contingut de colesterol total als extractes lipídics del fetge i la melsa als 15, 30 i 60 dies d'edat (A) i del pulmó, el teixit adipós, el ronyó i la bufeta als 60 dies d'edat (B). Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 4-10 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

Per altra banda, es va analitzar l'acumulació de colesterol a les mostres del fetge i la melsa dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> femelles entre els 15 i els 60 dies d'edat. Tal com es va observar als mascles, les femelles presentaven un increment de colesterol en ambdós teixits analitzats a partir dels 15 dies d'edat (Figura 26).



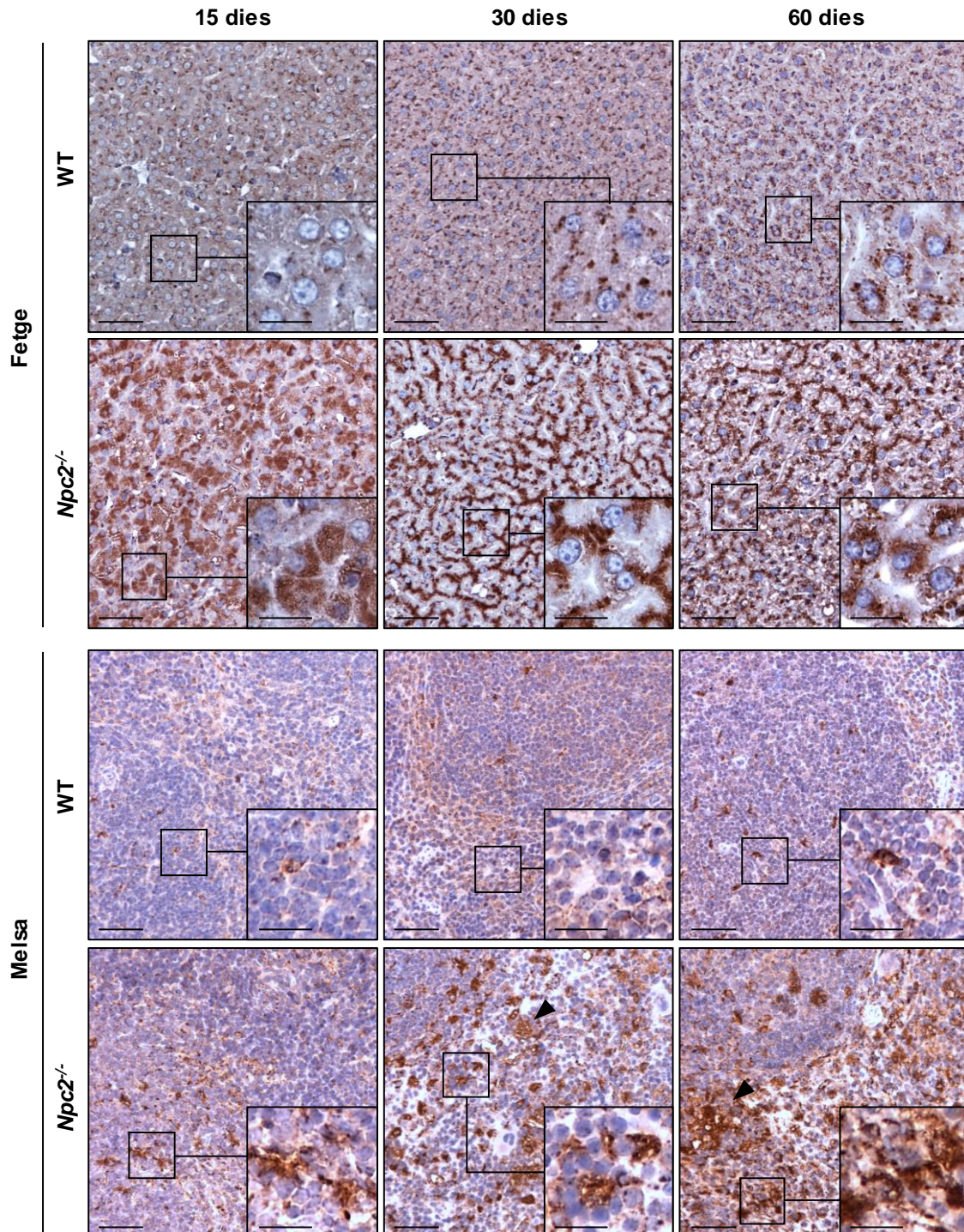
**Figura 26. Determinació del contingut de colesterol als teixits somàtics de ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> femelles.** Quantificació del contingut de colesterol total als extractes lipídics del fetge i la melsa de ratolins femelles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> als 15, 30 i 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-10 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

### 3.2. Distensió lisosòmica

La distensió lisosòmica es va analitzar a les seccions del fetge, la melsa i el pulmó per immunohistoquímica mitjançant la detecció dels lisosomes amb el marcador LIMP2. A partir dels 15 dies d'edat, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles presentaven un senyal positiu de LIMP2 molt més intens als tres teixits perifèrics analitzats que la dels animals WT (Figura 27 i Figura 28). Tant al fetge com al pulmó, la marca positiva era generalitzada a tot el teixit, mentre que a la melsa, el senyal positiu de LIMP2 es localitzava principalment a la polpa blanca, tot i que també estava augmentada a la polpa vermella. Quan es va estudiar la morfologia de les cèl·lules marcades, es van observar cèl·lules d'aspecte espumós, especialment al pulmó a partir dels 15 dies d'edat i a la melsa a partir dels 30 dies (Figura 27 i Figura 28). Les cèl·lules d'aspectes espumós són habitualment macròfags plens de colesterol, que s'han detectat tant en pacients de la NPC (*Vanier, 2010*) com en models murins de la NPC1 (*NeBlauer, 2019*). Aquests resultats indicaven que la distensió lisosòmica era una alteració patològica que s'iniciava

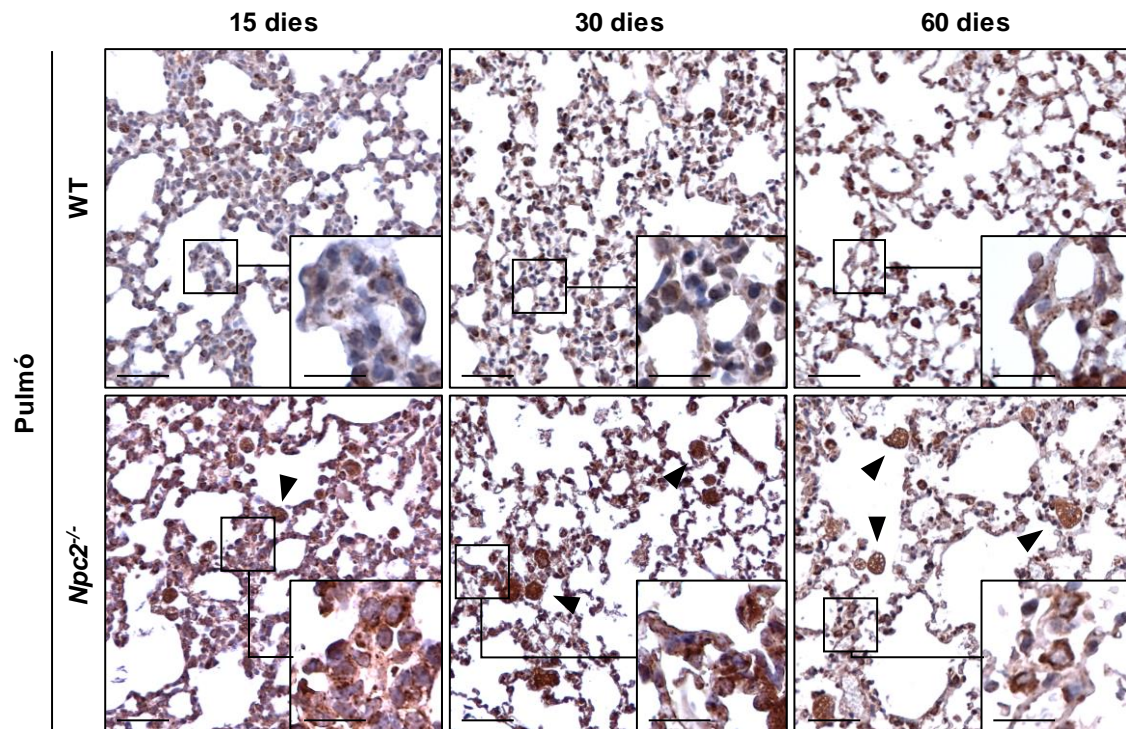


ben aviat al model murí de la NPC2 i afectava a diversos tipus cel·lulars de cada teixit analitzat.



**Figura 27. Distensió del compartiment lisosòmic al fetge i la melsa dels ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup>.** La distensió lisosòmica es va analitzar a les seccions del fetge i la melsa dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mitjançant la immunohistoquímica amb el marcador lisosòmic LIMP2 a 15, 30 i 60 dies d'edat. Barra d'escala: 50 µm (20 µm a l'ampliació). Imatges representatives de 4-5 animals per grup.



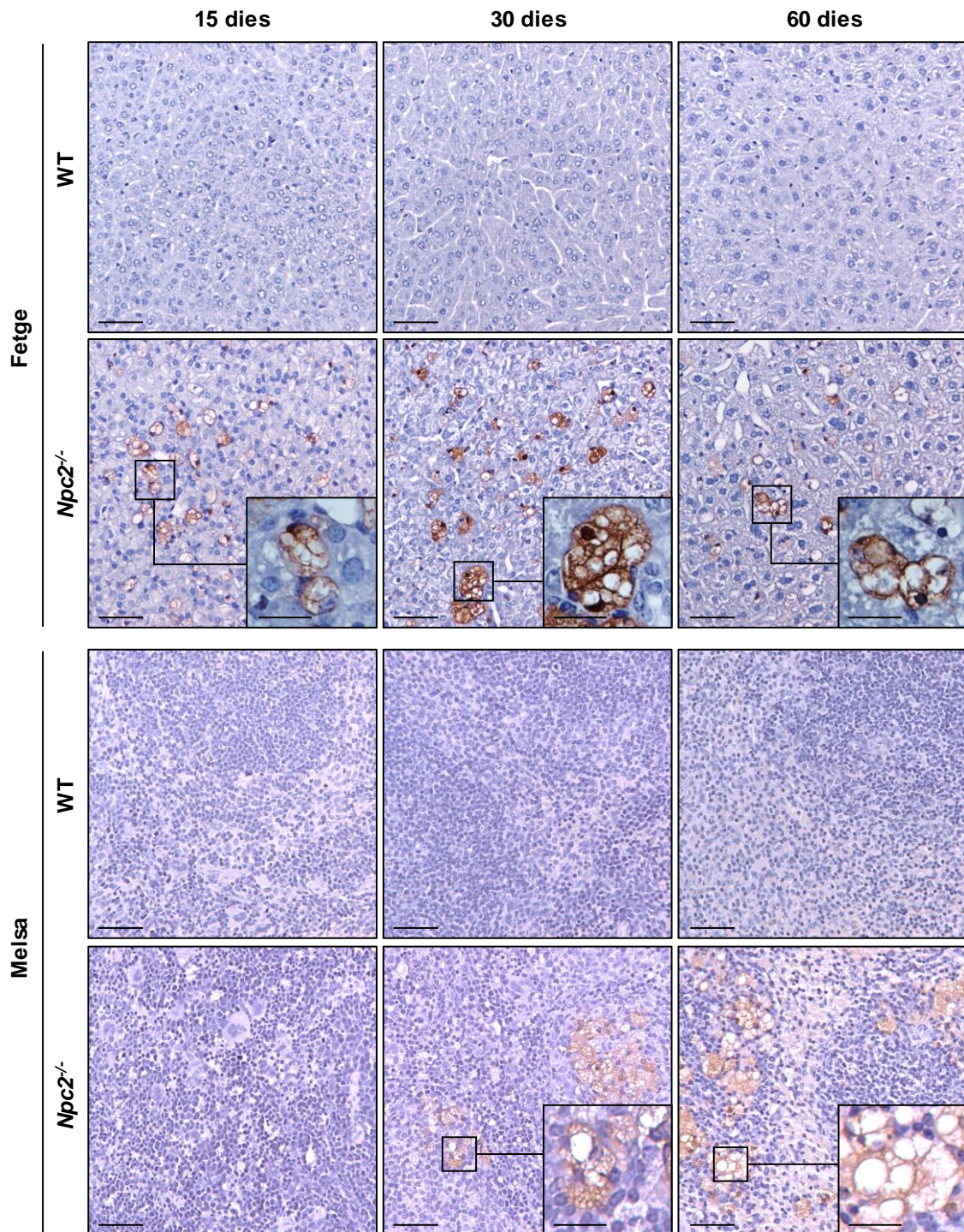


**Figura 28. Distensió del compartiment lisosòmic al pulmó dels ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup>.** La distensió lisosòmica es va analitzar a les seccions del pulmó dels ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mitjançant la immunohistoquímica amb el marcador lisosòmic LIMP2 a 15, 30 i 60 dies d'edat. Barra d'escala: 50 µm (20 µm a l'ampliació). Imatges representatives de 4-5 animals per grup.

### 3.3. Inflamació als teixits perifèrics

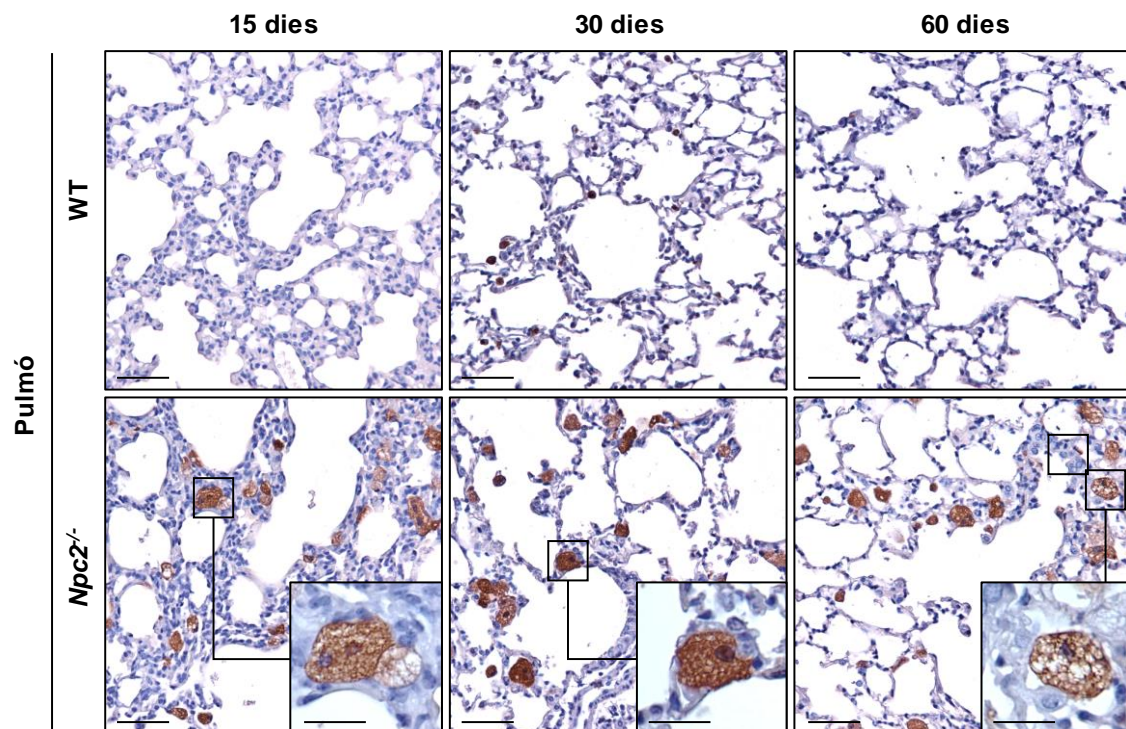
Per tal de detectar si hi havia inflamació als teixits perifèrics, es va realitzar una immunohistoquímica contra el marcador Mac-2 (Galectina-3), que s'uneix als macròfags activats (Dong, 1997). Mentre que els ratolins WT no van presentar cap senyal positiu per Mac-2, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles tenien cèl·lules marcades al fetge i al pulmó a totes les edats analitzades (Figura 29 i Figura 30). A la melsa, en canvi, no es va detectar l'activació de macròfags fins als 30 dies d'edat, fet que es va mantenir fins als 60 dies (Figura 29). A diferència de la immunohistoquímica contra LIMP2 (Figura 27), tant la polpa vermella com la polpa blanca tenien una intensitat de senyal positiu semblant, indicant que la infiltració dels macròfags succeïa homogèniament a tota la melsa. A més a més, tal com s'havia observat prèviament amb la immunohistoquímica contra LIMP2 (Figura 27), les cèl·lules marcades amb Mac-2 contenien múltiples vesícules i presentaven un aspecte espumós a tots els teixits perifèrics analitzats (Figura 29 i Figura 30).





**Figura 29. Estudi de la inflamació al fetge i la melsa dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles.** Immunohistoquímica contra Mac-2, un marcador de macròfags activats, a les mostres del fetge i la melsa dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles als 15, 30 i 60 dies d'edat. Barra d'escala: 50 µm (20 µm a l'ampliació). Imatges representatives de 4-5 animals per grup.

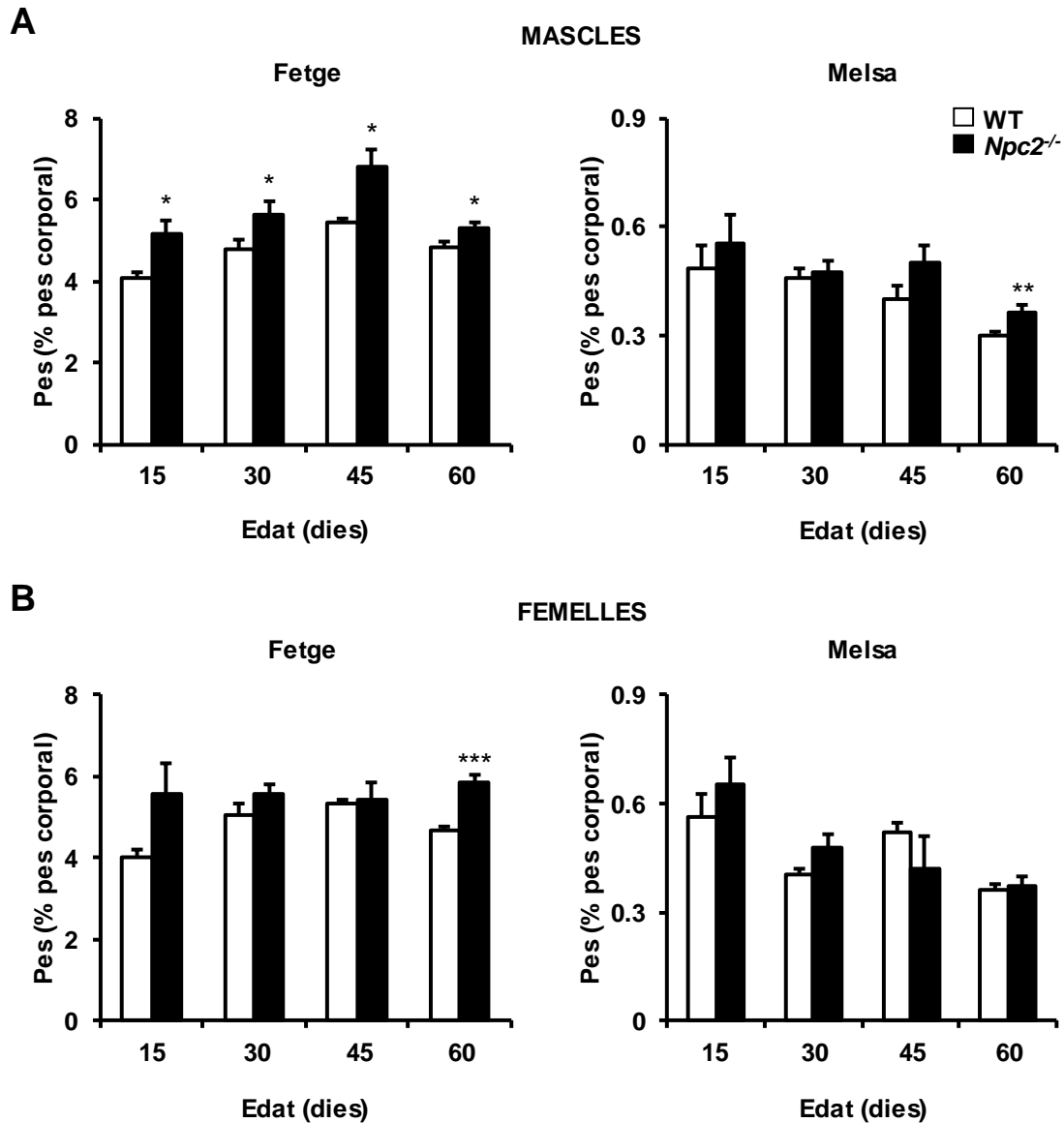




**Figura 30. Estudi de la inflamació al pulmó dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles.** Immunohistoquímica contra Mac-2, un marcador de macròfags activats, a les seccions del pulmó dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles als 15, 30 i 60 dies d'edat. Barra d'escala: 50 µm (20 µm a l'ampliació). Imatges representatives de 4-5 animals per grup.

### 3.4. Hepatosplenomegàlia

Una de les alteracions més habituals a les LSD amb afectació dels teixits perifèrics és l'increment del pes del fetge i la melsa, fet que també s'ha descrit als pacients humans de la NPC2 (Millat, 2001; Parenti, 2015). Aleshores, es va analitzar el pes del fetge i la melsa relatiu al pes corporal dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> d'ambdós sexes a diverses edats. Els mascles homozigots van desenvolupar hepatomegàlia a partir dels 15 dies d'edat, mentre que l'esplenomegàlia no va ser evident fins a l'edat més tardana analitzada (60 dies d'edat) (Figura 31A). Comparativament, les femelles no van desenvolupar aquest símptoma de forma tant evident: l'hepatomegàlia no va aparèixer fins als 60 dies d'edat i no van arribar a desenvolupar l'esplenomegàlia a les edats estudiades (Figura 31B).



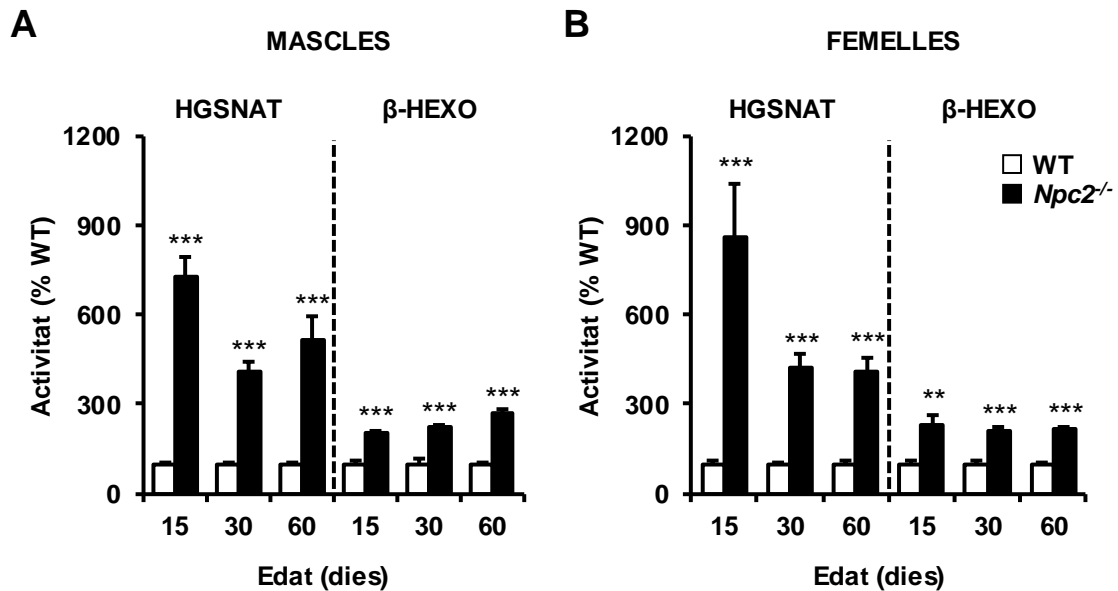
**Figura 31. Estudi de l'hepatosplenomegàlia al model murí de la NPC2. (A,B)** Quantificació del pes relatiu del fetge i la melsa als ratolins mascles (A) i femelles (B) WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> a les edats de 15, 30, 45 i 60 dies. Els pes dels òrgans es mostra de forma relativa al pes corporal de l'animal. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 2-4 al grup experimental de 15 dies i de 15 animals per grup, a la resta de grups experimentals. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT

### 3.5. Homeòstasi lisosòmica

#### 3.5.1. Alteracions patològiques al fetge

L'estat de l'homeòstasi lisosòmica al fetge es va caracteritzar mitjançant la determinació de l'activitat de diversos enzims lisosòmics involucrats en la degradació de substrats. A totes les edats analitzades, els ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup> tenien augmentada

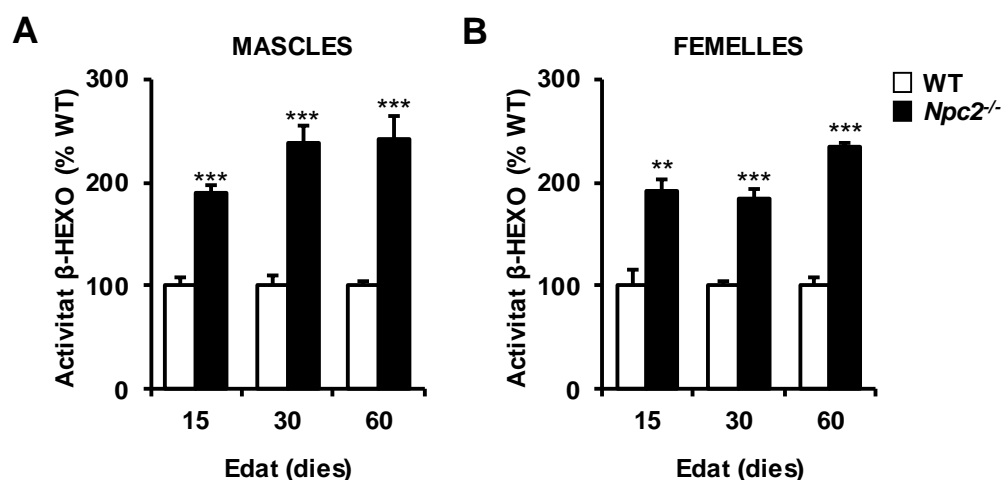
l'activitat  $\beta$ -HEXO i HGSNAT respecte els valors dels animals WT (Figura 32A). De manera similar, les femelles  $Npc2^{-/-}$  presentaven un augment de l'activitat enzimàtica  $\beta$ -HEXO i HGSNAT des dels 15 dies fins als 60 dies d'edat (Figura 32B).



**Figura 32. Alteració de l'homeòstasi lisosòmica al fetge dels ratolins  $Npc2^{-/-}$ .** (A,B) Anàlisi de l'activitat dels enzims lisosòmics HGSNAT i  $\beta$ -HEXO realitzades als extractes proteics de fetge dels ratolins WT i  $Npc2^{-/-}$  mascles (A) i femelles (B). Les activitats es van determinar als 15, 30 i 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 4-5 animals per grup. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

### 3.5.2. Alteració de l'activitat $\beta$ -HEXO al sèrum

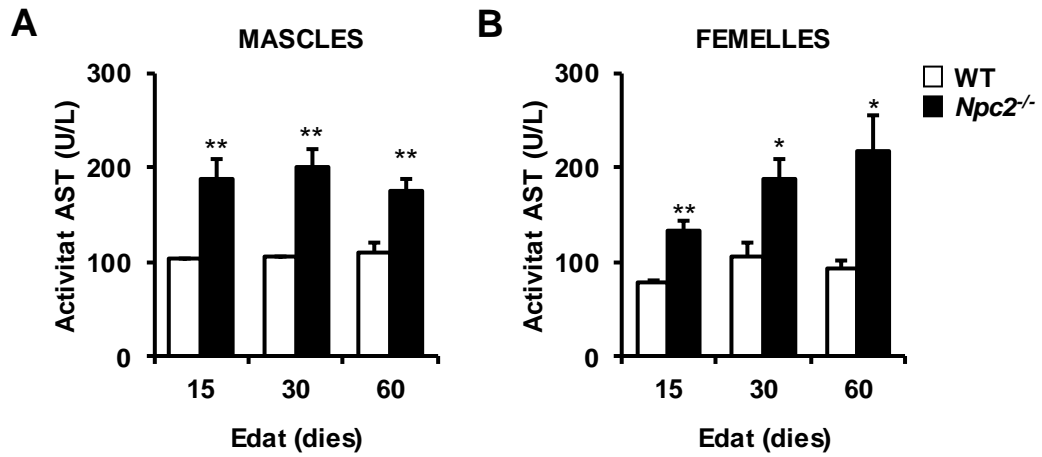
En algunes LSD, com la MPSII, s'han detectat uns nivells augmentats de  $\beta$ -HEXO al sèrum com a conseqüència de la desregulació al fetge (Motas, 2016). Per tant, es va analitzar l'activitat  $\beta$ -HEXO a les mostres de sèrum dels ratolins WT i  $Npc2^{-/-}$  entre els 15 i els 60 dies d'edat. En concordança amb l'increment d'activitat  $\beta$ -HEXO al fetge, l'activitat  $\beta$ -HEXO també estava augmentada a les mostres de sèrum de ratolins  $Npc2^{-/-}$  mascles (Figura 33A) i femelles (Figura 33B) respecte els animals WT a totes les edats analitzades. Aquests resultats indicaven que l'alteració de l'homeòstasi no es limitava només al fetge, sinó que els nivells circulants també estaven afectats.



**Figura 33. Activitat β-HEXO al sèrum dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>.** Determinació de l'activitat β-HEXO al sèrum dels ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles (A) i femelles (B) a 15, 30 i 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

### 3.6. Dany hepàtic

Quan hi ha alteracions patològiques al fetge, la membrana dels d'hepatòcits esdevé més permeable i provoca l'alliberació de transaminases hepàtiques al sèrum. Així doncs, un augment en l'activitat de les transaminases al sèrum, que en condicions normals són baixes, s'acostuma a utilitzar com a marcador de dany hepàtic (Olaeye, 2008). Com que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> presentaven alteracions patològiques al fetge, es va mesurar l'activitat de l'aspartat-aminotransferasa (AST) a sèrum. A partir dels 15 dies i fins als 60 dies d'edat, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>, tant els mascles (Figura 34A) com les femelles (Figura 34B), tenien un augment moderat però estadísticament significatiu de l'activitat AST a sèrum, fet que evidenciava el dany hepàtic al model murí de la NPC2.



**Figura 34. Determinació de l'activitat AST al sèrum dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>.** L'activitat de la transaminasa AST a sèrum, un marcador de dany hepàtic, es va mesurar als ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles (A) i femelles (B) a les edats de 15, 30 i 60 dies. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 4-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. WT.

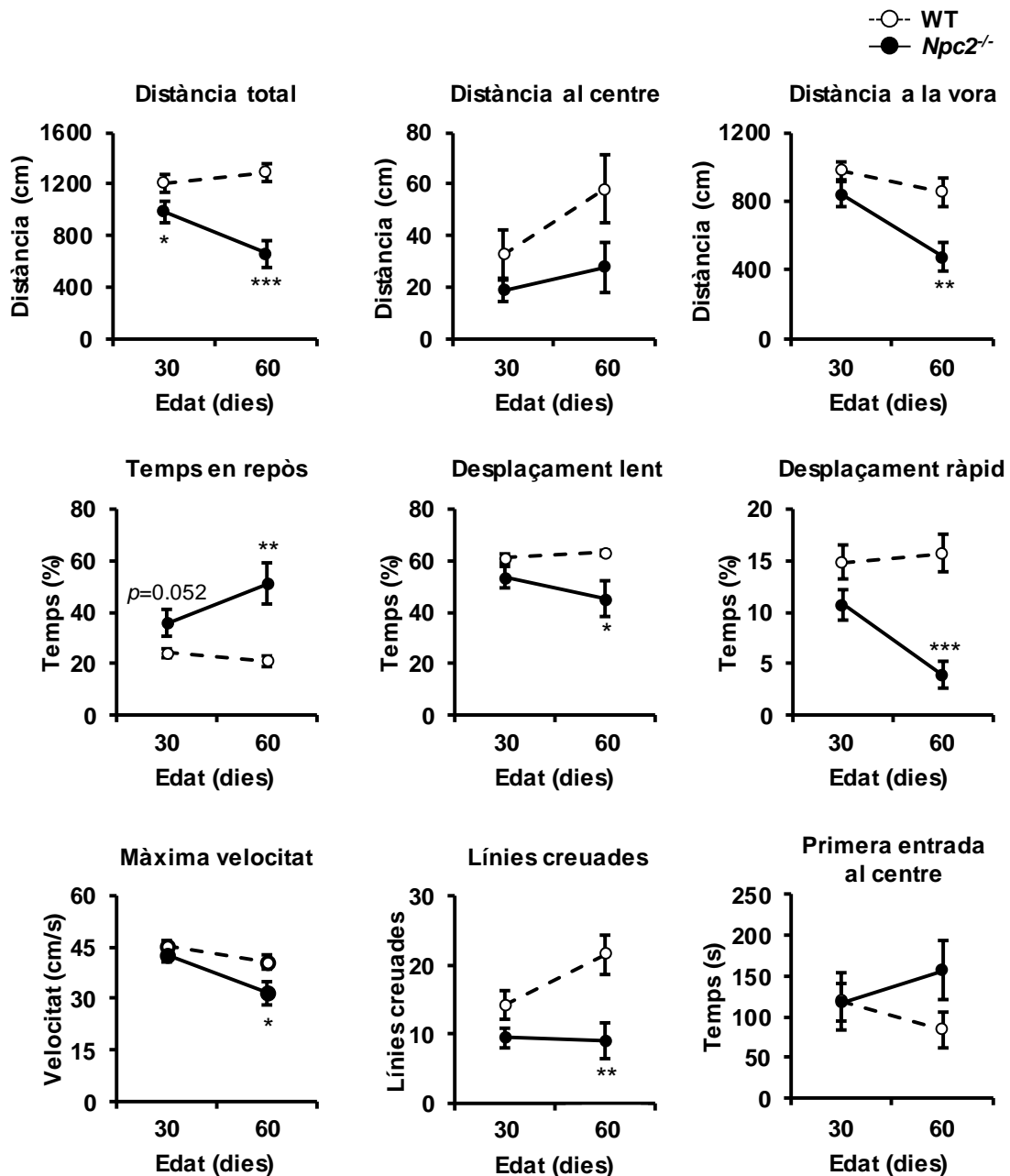
## 4. AVALUACIÓ DEL COMPORAMENT

Uns dels símptomes més típics dels pacients de NPC són els problemes locomotors. La gran majoria de pacients els presenten en forma d'atàxia, alteracions de la coordinació i problemes en la marxa (Bonnot, 2019). La deleció del gen *Npc2* va provocar un caminar atàxic, caracteritzat per ser un caminar inestable amb tremolors a les potes dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>. Per tal de caracteritzar la capacitat locomotora i de coordinació, es van realitzar les següents proves de comportament: prova de l'actímetre, prova del *rotarod* i el *mesh test* (prova de la reixa).

### 4.1. Prova de l'actímetre

L'actímetre consisteix en una arena dividida virtualment en 3 regions quadrades concèntriques: el centre (el quadrat central), la vora (el quadrat més exterior) i el perímetre (excloent el centre, la resta de l'espai). Mitjançant una càmera s'estudia el desplaçament dels ratolins a través de les diferents regions durant un temps determinat. Com que els ratolins s'acostumen a l'actímetre, aquesta prova només es va realitzar un cop a ratolins no testats anteriorment (Marcó, 2016).

A l'edat de 30 dies, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles van començar a presentar alteracions locomotores, evidenciat per una reducció de la distància total recorreguda. A més a més, també van presentar una tendència a estar més estona en repòs, desplaçar-se a una velocitat més lenta i a creuar menys vegades les diferents zones de l'actímetre (Figura 35). Als 60 dies d'edat, en canvi, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles van presentar diferències estadísticament significatives respecte els animals WT en la majoria dels paràmetres analitzats. Concretament, es va observar una reducció d'aproximadament el 50% del desplaçament total, van passar el doble de temps en repòs, el desplaçament a velocitat alta (>15 cm/s) va ser 3 vegades menor i ho van fer a una velocitat màxima inferior i, finalment, el nombre de canvis de zona també va ser menor. Cal destacar que no només van obtenir resultats menors respecte els animals WT, sinó que també ho van fer respecte els valors obtinguts a 30 dies (Figura 35), indicant una progressió de la malaltia.

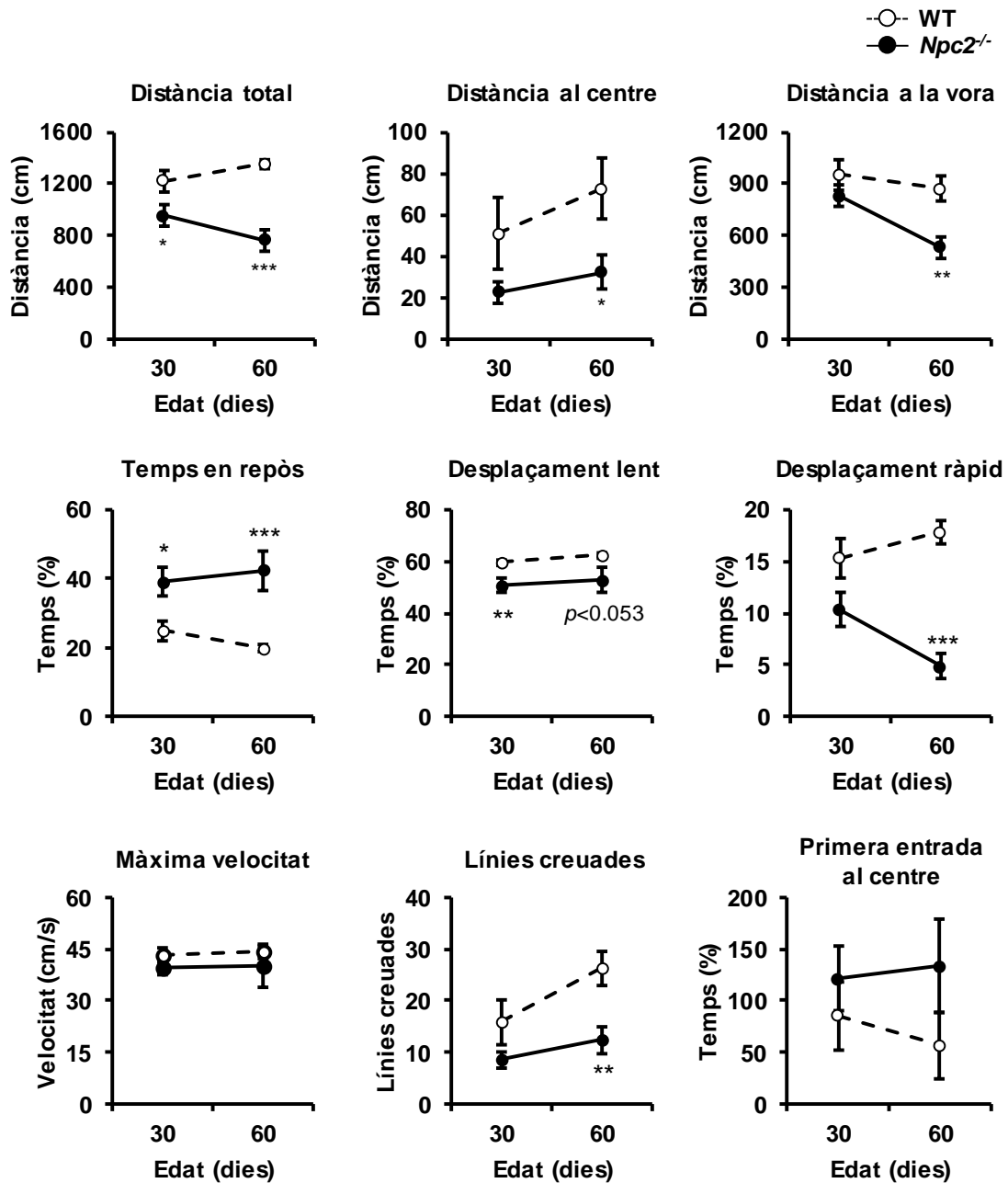


**Figura 35. Alteracions del comportament als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles.** Resultats de la prova de l'actímetre realitzada als 30 i 60 dies d'edat als ratolins mascles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup>, naïf pel test. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 12-13 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

Per altra banda, també es va estudiar el comportament locomotor de les femelles *Npc2*<sup>-/-</sup> als 30 i 60 dies d'edat. Als 30 dies, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> femelles van presentar diferències significatives respecte els animals WT a més paràmetres que els observats als ratolins mascles (Figura 36). Així doncs, es va detectar una disminució estadísticament significativa tant de la distància total recorreguda com del desplaçament lent, així com un major percentatge de temps en repòs. Posteriorment, als 60 dies d'edat,



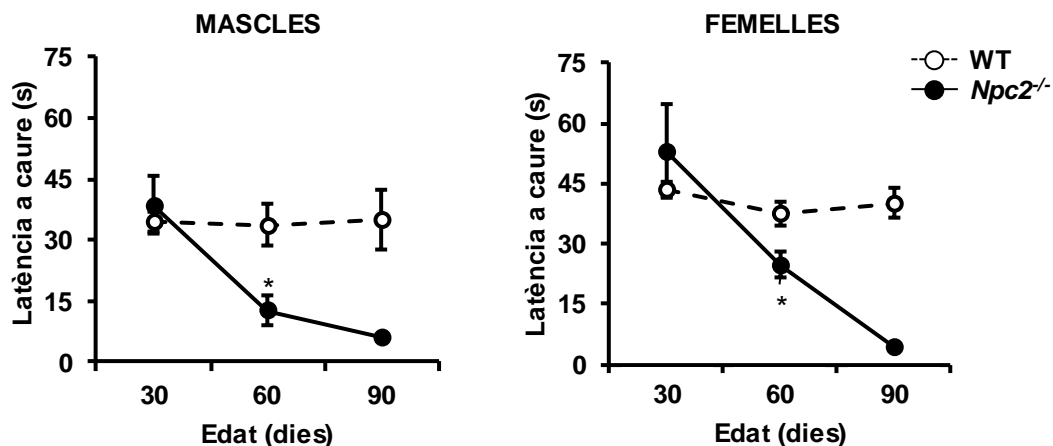
els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar nivells d'activitat locomotora inferiors als observats als 30 dies d'edat, i significativament inferiors als dels animals WT (Figura 36), fet que confirmava el caràcter progressiu de la malaltia.



**Figura 36. Alteracions del comportament als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> femelles.** Resultats de la prova de l'actímetre realitzada als 30 i 60 dies d'edat als ratolins femelles WT i *Npc2*<sup>-/-</sup>, naïf pel test. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 11-14 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

#### 4.2. Prova del rotarod i mesh test

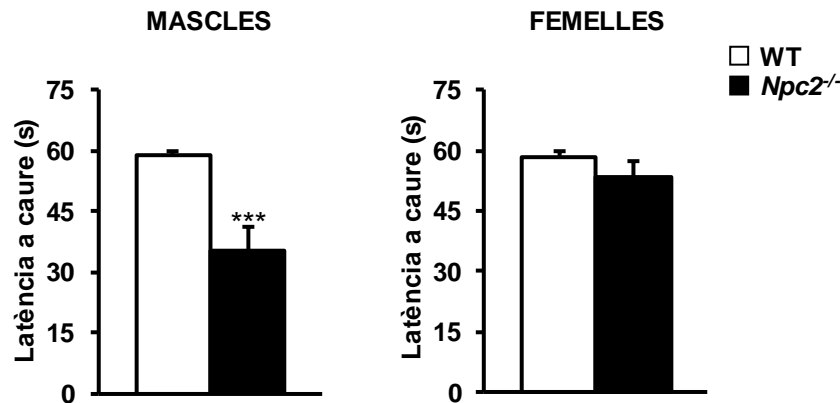
Amb la finalitat de mesurar els problemes de coordinació, es van realitzar les proves del *rotarod* i el *mesh test*. El *rotarod* és un aparell de consta d'un cilindre rotatori damunt del qual es col·loquen els ratolins. Aquest cilindre s'accelera de forma constant, de tal manera que els ratolins amb major coordinació romanen més temps damunt del cilindre i els ratolins amb menor coordinació cauen abans. Es va mesurar la latència a caure del *rotarod* dels animals *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles i femelles a les edats de 30 i 60 dies. A més a més, un animal homozigot de cada sexe va sobreviure fins als 90 dies i també es va analitzar a la prova del *rotarod*. Els animals WT van romandre un temps similar sobre el *rotarod* a totes les edats analitzades. En canvi, tot i que a 30 dies els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> van romandre un temps sobre el *rotarod* similar al dels WT, als 60 dies d'edat van presentar una latència a caure unes 3 vegades menor (Figura 37). Els dos animals d'ambdós sexes que van sobreviure fins als 90 dies d'edat presentaven una execució del test pitjor que els animals analitzats prèviament. Per tant, aquestes dades indicaven que el model murí de la NPC2 presentava problemes de coordinació evidents i progressius a partir dels dos mesos d'edat.



**Figura 37. Prova del rotarod al ratolí model de la NPC2.** La coordinació es va mesurar en animals WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> d'ambdós sexes a les edats de 30, 60 i 90 dies mitjançant la prova del rotarod. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 6-9 animals per grup. \*  $p < 0.05$  vs. WT.

Per altra banda, es va realitzar la prova del *mesh test*, que consisteix en una reixa metàl·lica damunt de la qual es col·loquen els ratolins. Posteriorment, s'inverteix la reixa i els ratolins queden suspesos cap per avall mentre exploren la reixa. Els ratolins amb menys coordinació no col·loquen correctament les potes i acostumen a presentar una latència a caure disminuïda. A més a més, aquesta prova també mesura la capacitat

del ratolí d'aguantar el seu propi pes i, per tant, també és una mesura indirecta de la força. El *mesh test* es va realitzar als 60 dies d'edat. En mascles, els ratolins WT es van mantenir pràcticament els 60 segons aferrats a la xarxa. En canvi, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles van mostrar signes de descoordinació i van caure als  $35.23 \pm 5.77$  s (Figura 38). Aquest comportament no es va observar en femelles, ja que només van presentar una lleugera tendència a la reducció de la latència a caure (Figura 38).



**Figura 38. Anàlisi de la coordinació al model murí de la *Npc2*<sup>-/-</sup>.** La coordinació es va mesurar als ratolins WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> d'ambdós sexes als 60 dies d'edat mitjançant la prova del *mesh test*. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 6-9 animals per grup. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. WT.

En conjunt, aquests resultats indicaven que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> desenvolupaven les principals característiques patològiques del fenotip infantil precoç de la patologia humana, a partir dels 15 dies d'edat i empitjorava progressivament amb l'edat i de manera similar a ambdós sexes. Així doncs, el ratolí model de la NPC2 és un bon model per a l'estudi de la fisiopatologia de la malaltia, així com també pel desenvolupament de noves estratègies terapèutiques pel tractament de la NPC2.

***Part 2. Desenvolupament d'una aproximació de  
teràpia gènica per a la NPC2***



## 1. CONSTRUCCIÓ DEL VECTOR VIRAL ADENOASSOCIAT DE SEROTIP 9 CODIFICANT PER LA PROTEÏNA NPC2

Com que el ratolí model de la NPC2 generat a la primera part d'aquesta tesi recapitulava les principals alteracions patològiques observades a la malaltia humana, es va decidir desenvolupar una aproximació de teràpia gènica en aquest model murí per al tractament de la malaltia de NPC2. El protocol va consistir en l'administració del vector AAV de serotip 9 amb una còpia de la seqüència codificant optimitzada del gen *Npc2* murí sota el control del promotor d'expressió ubiqüa CAG (promotor híbrid format pel potenciador de la transcripció del citomegalovirus, el promotor de la  $\beta$ -actina i el primer intró del gen de la  $\beta$ -globina humana). L'AAV9 és un serotip amb una àmplia distribució al SNC i també és molt eficient transduint el fetge després de l'administració directament al líquid cefalorraquídi (LCR) a través de la cisterna magna (Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017), dos dels teixits més afectats a la malaltia de NPC2. La cisterna magna és un engrandiment de l'espai subaracnoidal entre el cerebel i la medulla oblonga pel qual flueix el LCR procedent del quart ventricle. L'administració del vector AAV9 a la cisterna magna és capaç de difondre a tot l'encèfal a través del LCR i condueix a una àmplia i eficient transducció de tot el SNC. A més a més, part del vector drena juntament amb el LCR cap a la sang i permet que també pugui transduir el fetge. El fetge produeix i secreta les proteïnes lisosòmiques a la sang, que poden corregir altres òrgans perifèrics no transduïts gràcies al mecanisme de la correcció creuada (Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017). Aquest fenomen es basa en el fet que les proteïnes lisosòmiques tenen residus manosa 6-fosfat que en permeten l'entrada a una cèl·lula no transduïda gràcies als receptors manosa 6-fosfat que estan ubicats a la membrana plasmàtica de qualsevol cèl·lula de l'organisme.

Pel disseny i la construcció del plasmidi de producció del vector terapèutic, es va utilitzar la seqüència codificant del gen *Npc2* murí (CCDS ID: 26050.1), la qual va ser optimitzada amb la finalitat d'augmentar-ne l'expressió (Disbrow, 2003). Aquesta seqüència *omNpc2* (*o*, indica optimitzada; *m*, indica *Mus musculus*) es va clonar al plasmidi pAAV-CAG que conté el promotor quimèric d'expressió ubiqüa CAG i el senyal de poliadenilació (PoliA) de la  $\beta$ -globina de conill, flanquejat per les repeticions terminals invertides (ITR, *Inverted Terminal Repeats*) de l'AAV2 (Figura 39). El plasmidi generat, el pAAV-CAG-*omNpc2*, es va utilitzar per a la producció del vector viral AAV9-*Npc2* mitjançant el mètode de la triple transfecció en cèl·lules HEK293.



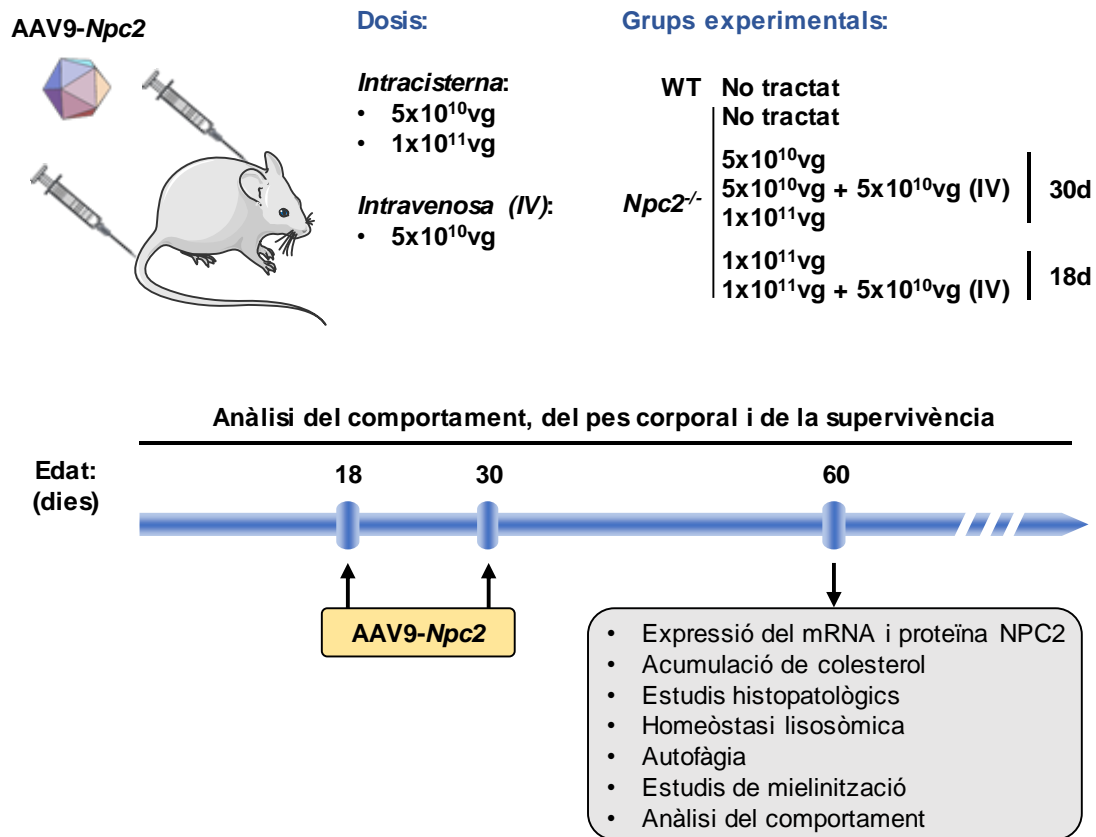
**Figura 39. Representació esquemàtica del vector viral AAV9-Npc2.** El constructe consisteix en la seqüència codificant optimitzada del gen *Npc2* de ratolí (*omNpc2*) sota el control transcripcional del promotor ubicu CAG (promotor híbrid format pel potenciador de la transcripció del citomegalovirus, el promotor de la  $\beta$ -actina i el primer intró del gen de la  $\beta$ -globina humana) i la cua de poliadenilació de la  $\beta$ -globina (PoliA) de conill, flanquejat per les ITRs de l'AAV2.

## 2. DISSENY EXPERIMENTAL

La malaltia de NPC2 és una patologia principalment del SNC amb una afectació variable dels òrgans perifèrics que, sobretot, afecta al fetge, la melsa i el pulmó (*Vanier, 2010*). Per tant, és necessari desenvolupar un tractament per aquesta malaltia que permeti corregir tots els òrgans amb alteracions, però sobretot el SNC. El nostre laboratori ha desenvolupat diverses aproximacions de teràpia gènica basades en l'administració del vector viral AAV9 al LCR a través de la cisterna magna (*Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017*).

El model murí de la NPC2 desenvolupat en aquesta tesi presenta una patologia de progressió molt ràpida i severa al SNC i als òrgans perifèrics, que està molt ben establerta als 15 dies d'edat i condueix a una esperança de vida de 78 dies (2.6 mesos) de mediana. Per tal de dissenyar la millor aproximació de teràpia gènica per a tractar aquesta malaltia, es va decidir estudiar l'efecte de diferents dosis, vies d'administració i edats de tractament (Figura 40). Amb aquesta finalitat, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van ser tractats als 18 o als 30 dies d'edat. Als 18 dies la majoria de les alteracions patològiques de la malaltia ja estaven establertes, mentre que als 30 dies d'edat tota la patologia característica de la NPC2 estava més exacerbada. Aleshores, l'efecte del tractament podria ser variable en funció de l'edat d'injecció dels ratolins. Les vies d'administració utilitzades a les nostres aproximacions terapèutiques per la NPC2 van ser l'administració intracisterna (IC) i en alguns casos també la co-administració per via intravenosa (IV). L'administració IC va consistir en la injecció a la cisterna magna de  $5 \times 10^{10}$  genomes virals (vg, *vector genomes*) per animal o de  $1 \times 10^{11}$  vg/animal. A causa de la severa afectació observada en alguns òrgans perifèrics al model murí de la NPC2, com el fetge, el pulmó i la melsa, en comparació amb altres malalties estudiades anteriorment, es va realitzar una co-administració intravenosa de  $5 \times 10^{10}$  vg/animal en alguns grups experimentals, per tal d'estudiar si s'aconseguia millorar les alteracions perifèriques.

L'estudi d'eficàcia terapèutica es va realitzar als 60 dies d'edat en ratolins mascles, és a dir, 42 o 30 dies post-tractament per als animals injectats a 18 o 30 dies d'edat, respectivament. A aquests animals tractats es va analitzar el grau de correcció de la patologia mitjançant la determinació de diversos paràmetres bioquímics i els estudis immunohistoquímics, ultraestructurals i del comportament (actímetre i *mesh test*). A més a més, també es va analitzar l'efecte del vector terapèutic a llarg termini avaluant l'evolució del pes corporal, realitzant l'estudi del comportament (*rotarod*) i analitzant la supervivència (Figura 40).



**Figura 40. Disseny experimental.** El vector viral AAV9-Npc2 es va administrar per via intracisterna (IC) o bé per via IC i intravenosa (IV) a la vena caudal als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mascles a diferents dosis i edats. Als 60 dies d'edat, és a dir, 42 dies post-injecció pels animals tractats a 18 dies d'edat i 30 dies post-injecció pels tractats a 30 dies d'edat, es va eutanasiar una part dels animals de cada grup experimental per a obtenir-ne mostres i avaluar l'efecte del tractament en diversos paràmetres de la patologia. A la resta d'animals de cada grup experimental, es va fer una anàlisi del comportament a llarg termini (*rotarod*), un seguiment del pes corporal i se'n va analitzar la supervivència.



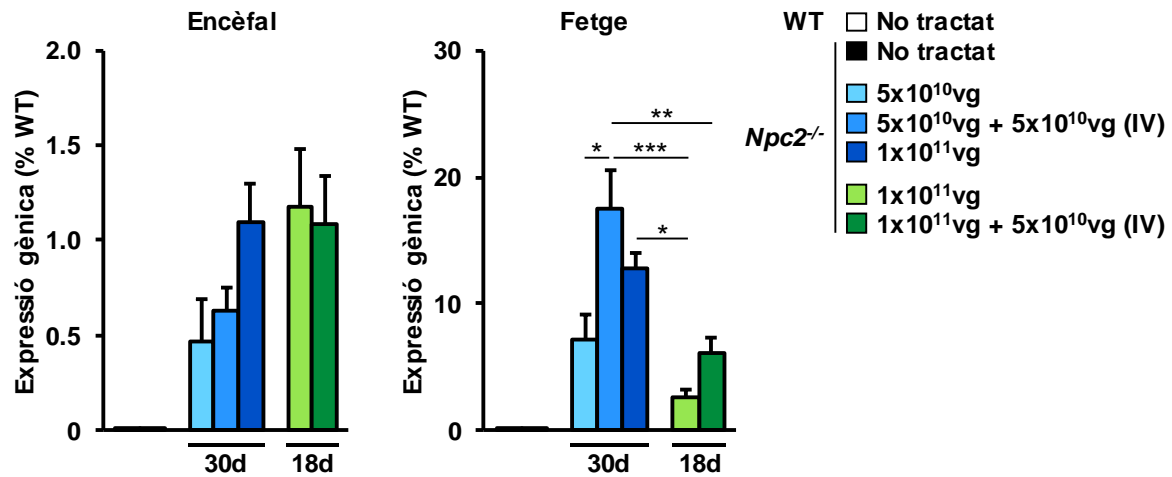
### 3. AVALUACIÓ GENERAL DE L'EFECTE DEL TRACTAMENT AMB L'AAV9-*Npc2*

#### 3.1. Expressió del mRNA *omNpc2* i de la proteïna NPC2

Per tal de verificar que el tractament dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> amb el vector viral AAV9-*Npc2* conduïa a un increment de l'expressió de la *Npc2*, es va quantificar els nivells de mRNA per qPCR a les mostres de l'encèfal i el fetge dels ratolins mascles als 60 dies d'edat. Com que es tracta d'una seqüència optimitzada (amb canvis a la seqüència de nucleòtids), no es va poder comparar els nivells d'expressió de l'*omNpc2* per qPCR respecte l'expressió endògena. A l'encèfal dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a la dosi alta intracisterna, és a dir,  $1 \times 10^{11}$ vg (30d),  $1 \times 10^{11}$ vg (18d) i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) (18d), es va detectar uns nivells d'expressió de l'*omNpc2* d'aproximadament el doble que els animals tractats a la dosi baixa intracisterna, és a dir,  $5 \times 10^{10}$ vg (30d) i  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) (30d), indicant que hi havia un efecte dosi-resposta. No es va observar cap efecte de l'edat d'injecció, 18 o 30 dies d'edat, ni de l'administració IV als nivells d'expressió de l'*omNpc2* a l'encèfal. Tal com s'esperava, els animals WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats no expressaven el gen *omNpc2* (Figura 41).

En canvi, l'expressió de l'*omNpc2* al fetge es va veure influenciada tant per l'edat de tractament com per la dosi i les vies d'administració utilitzades (Figura 41). Així doncs, els ratolins tractats a 30 dies presentaven uns nivells d'expressió de l'*omNpc2* superiors als animals tractats a 18 dies, possiblement provocat per la pèrdua del transgèn a causa de la divisió cel·lular hepàtica de les cèl·lules transduïdes. Per altra banda, els ratolins tractats amb una dosi intravenosa,  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) als 18 dies i  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) als 30 dies, tenien una expressió superior a la dels animals tractats amb la mateixa dosi intracisterna sense l'administració intravenosa, és a dir,  $1 \times 10^{11}$ vg (18d) i  $5 \times 10^{10}$ vg (30d), respectivament. Finalment, els ratolins tractats als 30 dies amb la dosi alta  $1 \times 10^{11}$ vg presentaven una expressió superior als animals tractats amb la dosi  $5 \times 10^{10}$ vg, però inferior a la dels tractats amb la dosi baixa més l'administració intravenosa,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) (Figura 41).

Per tant, l'administració intra-LCR del vector AAV9-*Npc2* va conduir a una expressió eficient tant al SNC com al fetge. La co-administració de part del vector per via intravenosa va resultar en un increment modest de l'expressió al fetge, sense efectes rellevants al SNC.

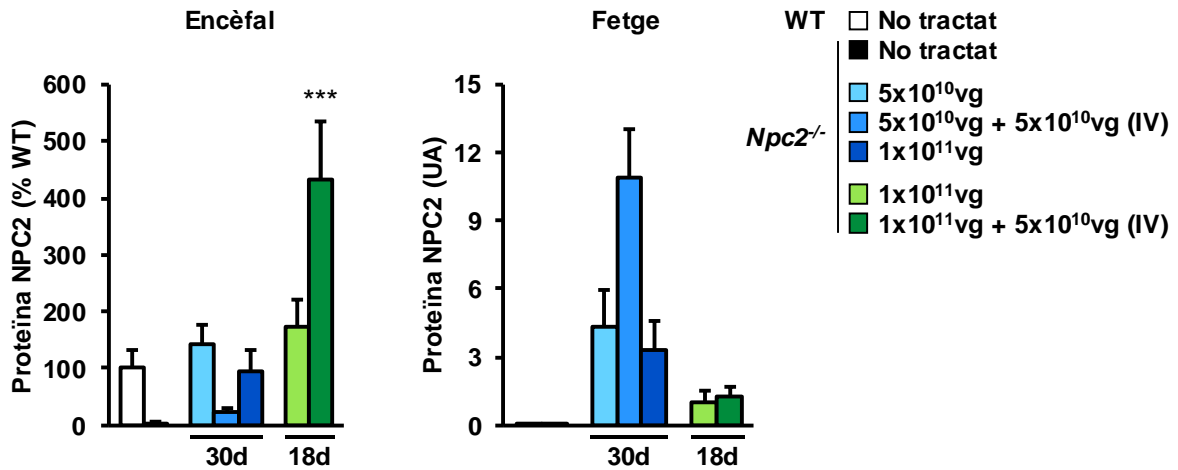


**Figura 41. Nivells d'expressió de l'omNpc2 a l'encèfal i el fetge dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats.** Quantificació dels nivells de mRNA d'*omNpc2* per qPCR als extractes de l'encèfal i el fetge dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 2 animals (WT i *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats) o 4-5 animals (*Npc2*<sup>-/-</sup> tractats) per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. els altres grups experimentals.

Els nivells de proteïna NPC2 es van mesurar als extractes proteics mitjançant la tècnica del *Western blot*, de tal manera que es podia detectar tant la NPC2 produïda per l'al·lel endogen com pel vector AAV9-*Npc2*, ja que l'optimització de la seqüència gènica no afecta a la seqüència proteica. Als 60 dies d'edat, no es va detectar la proteïna NPC2 ni a l'encèfal ni al fetge dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats. En canvi, el tractament amb el vector AAV9-*Npc2* va donar lloc a la síntesi de NPC2 a ambdós òrgans (Figura 42). Al SNC, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 18 dies d'edat amb les dosis 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) presentaven els nivells d'expressió de la NPC2 més elevats, en comparació a la resta de grups de tractament injectats a 30 dies d'edat, és a dir, 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg (Figura 42).

Al fetge, l'administració del vector AAV9-*Npc2* a qualsevol de les dosis i vies d'administració utilitzades va conduir a uns nivells d'expressió suprafisiològics, que no van permetre quantificar l'expressió de la NPC2 respecte els valors dels animals WT (Figura 42). En aquest teixit, es va observar un patró d'expressió similar entre la proteïna i el mRNA (Figura 42 i 41). Els ratolins tractats a 18 dies presentaven uns nivells d'expressió de la NPC2 menors que els tractats a 30 dies (Figura 42), possiblement a causa de la divisió cel·lular hepàtica pel creixement del fetge dels animals injectats més joves. Tal com s'esperava, els ratolins que van rebre la dosi IV a 30 dies d'edat, és a dir, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV), van mostrar els nivells més elevats d'expressió de la NPC2 (Figura 42). Per tant, tot i que l'administració per via intravenosa del vector viral AAV9-

*Npc2* permetia incrementar la dosi efectiva que arriba al fetge, tots els tractaments van conduir a una producció de la NPC2 suprafisiològica en aquest òrgan.



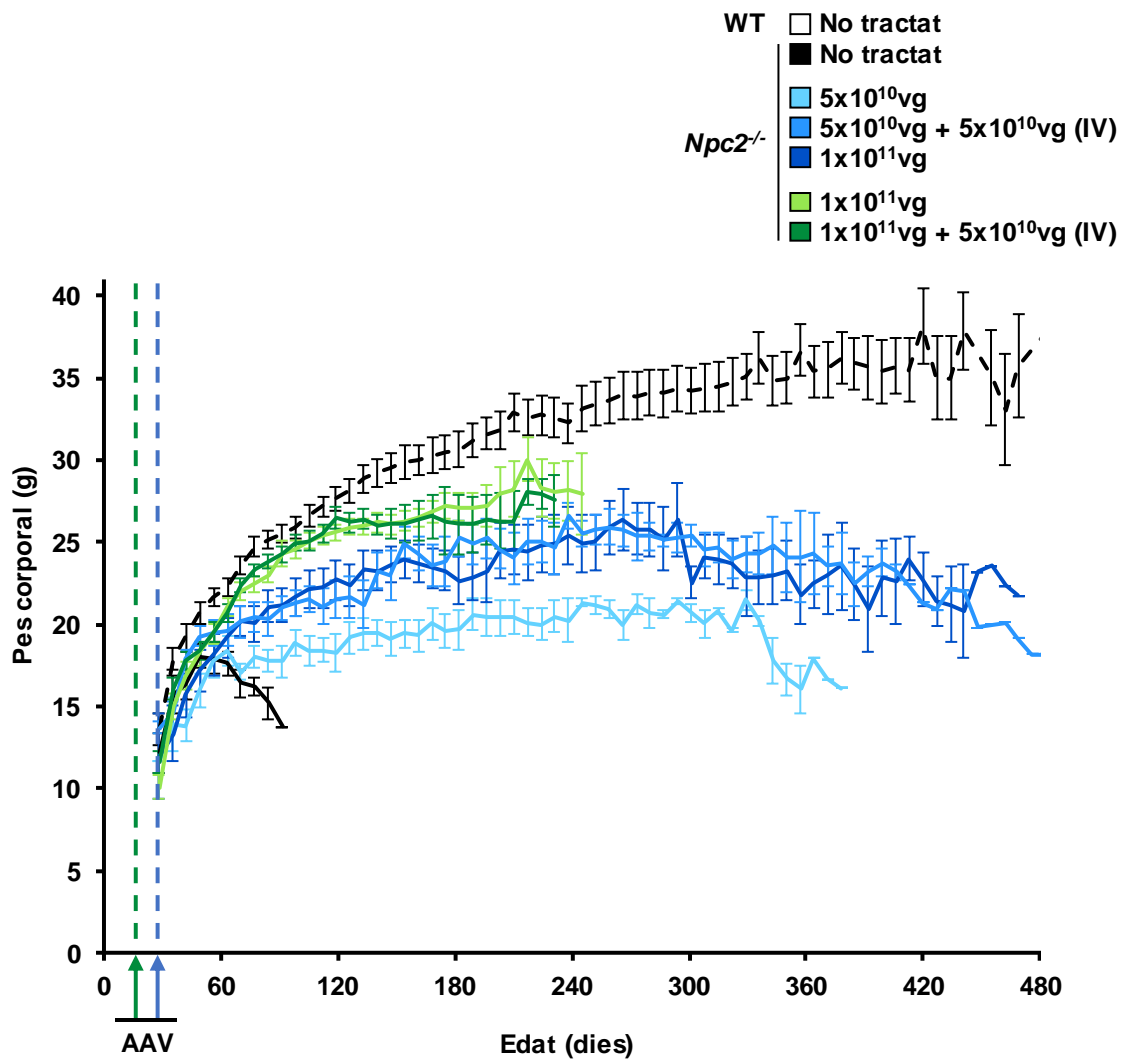
**Figura 42. Anàlisi de la proteïna NPC2 a l'encèfal i el fetge mitjançant el tractament amb AAV9-*Npc2*.**

Anàlisi de l'expressió de la proteïna NPC2 als extractes proteics de l'encèfal i el fetge mitjançant la tècnica de *Western blot* en ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Quantificació de 3 membranes de *Western blot* independents. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. la resta de grups experimentals.

### 3.2. Pes corporal

Com que es va observar que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tenien un creixement menor amb una pèrdua progressiva del pes corporal comparat amb el dels animals WT, es va analitzar si el tractament amb el vector AAV9-*Npc2* era capaç de millorar aquest paràmetre. Tots els tractaments van aconseguir estabilitzar o bé incrementar el pes corporal dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats (Figura 43). Als 7.7 mesos d'edat (230 dies, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 30 dies d'edat amb 5x10<sup>10</sup>vg van assolir un 62.8% del pes dels WT, els tractats amb 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) el 75.6% i els tractats amb 1x10<sup>11</sup>vg el 76.3%; mentre que els *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 18 dies d'edat amb 1x10<sup>11</sup>vg van assolir el 86.3% i els 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) el 84.5% (Figura 43). Així doncs, es va observar que l'edat d'injecció va tenir un efecte terapèutic important al pes corporal, ja que els ratolins tractats a 18 dies d'edat van presentar un pes més proper al dels animals WT i superior als animals tractats a 30 dies d'edat. Per altra banda, mentre tots els tractaments amb una dosi total mínima de 1x10<sup>11</sup> vg del vector viral AAV9-*Npc2* van incrementar el pes corporal per sobre del pic observat a les 7 setmanes d'edat dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats (18.09 g), als ratolins tractats amb la dosi total baixa 5x10<sup>10</sup>vg

a 30 dies d'edat només van assolir una estabilització del pes. Independentment de si la dosi total va ser administrada per via intracisterna o bé una part per via intracisterna i una altra intravenosa, l'efecte del tractament al pes corporal no va canviar substancialment. Aquest resultat suggeria que la co-administració del vector viral per via intravenosa no era imprescindible per assolir una millora del pes corporal.

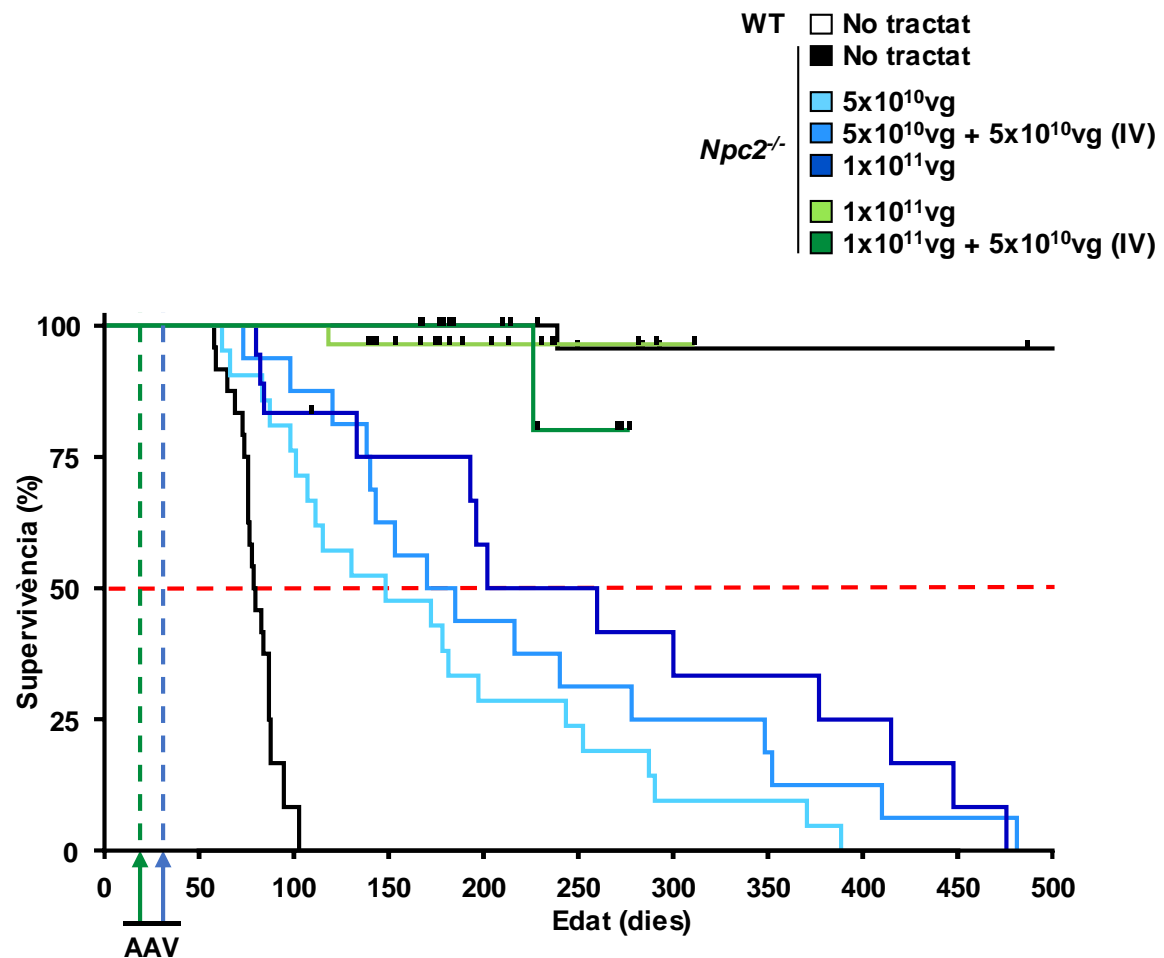


**Figura 43. Anàlisi del pes corporal després del tractament amb el vector AAV9-*Npc2*.** Estudi del pes corporal als ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Les dades es mostren com a la mitjana ± SEM de 12-26 animals per grup.

### 3.3. Supervivència

Un dels paràmetres més afectats per la deleció del gen *Npc2* va ser la supervivència. Mentre que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats tenien una mediana de

l'esperança de vida de 78 dies d'edat (2.62 mesos), tots els tractaments van aconseguir allargar-la significativament. De forma similar a les dades obtingudes del pes corporal, l'edat de tractament va ser la variable que va presentar un efecte més important a la supervivència. Els ratolins tractats a 18 dies mantenien una supervivència molt similar a la dels animals WT amb una supervivència del 96% als 315 dies d'edat amb el tractament de  $1 \times 10^{11}$ vg i del 82% als 275 dies d'edat pel grup administrat amb  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) (observació en curs). En canvi, els ratolins tractats a 30 dies d'edat van aconseguir allargar-la entre 2 i 3 vegades (Figura 44). Concretament, els ratolins tractats als 30 dies d'edat amb  $5 \times 10^{10}$ vg van tenir una mediana de supervivència de 147 dies (187% vs. els *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats,  $p < 0.001$ ); el grup tractat amb  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) de 176 dies (224% vs. els *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats,  $p < 0.001$ ); i el grup  $1 \times 10^{11}$ vg la van incrementar fins als 230 dies (293% vs. els *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats,  $p < 0.001$ ) (Figura 44), evidenciant un clar efecte dosi-resposta al paràmetre de la supervivència i indicant que l'administració de la totalitat de la dosi per via intracisterna és més efectiva que a través de la via intracisterna i intravenosa. L'increment del temps de supervivència als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats va demostrar l'eficàcia terapèutica de l'aproximació de teràpia gènica basada en l'administració del vector viral AAV9-*Npc2*, recolzant la seva futura translació cap a un estudi clínic en humans afectats per la NPC2.



**Figura 44. Anàlisi de la supervivència als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2*.** Estudi de la supervivència mitjançant l'anàlisi de Kaplan–Meier dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. L'administració del vector AAV s'indica amb una ratlla verda per als animals tractats 18 dies d'edat i en blau per als administrats a 30 dies. Les ratlles negres de les corbes de supervivència indiquen animals que són vius i l'observació segueix en curs. Les dades es mostren com a la mitjana ± SEM de 15-25 animals per grup.

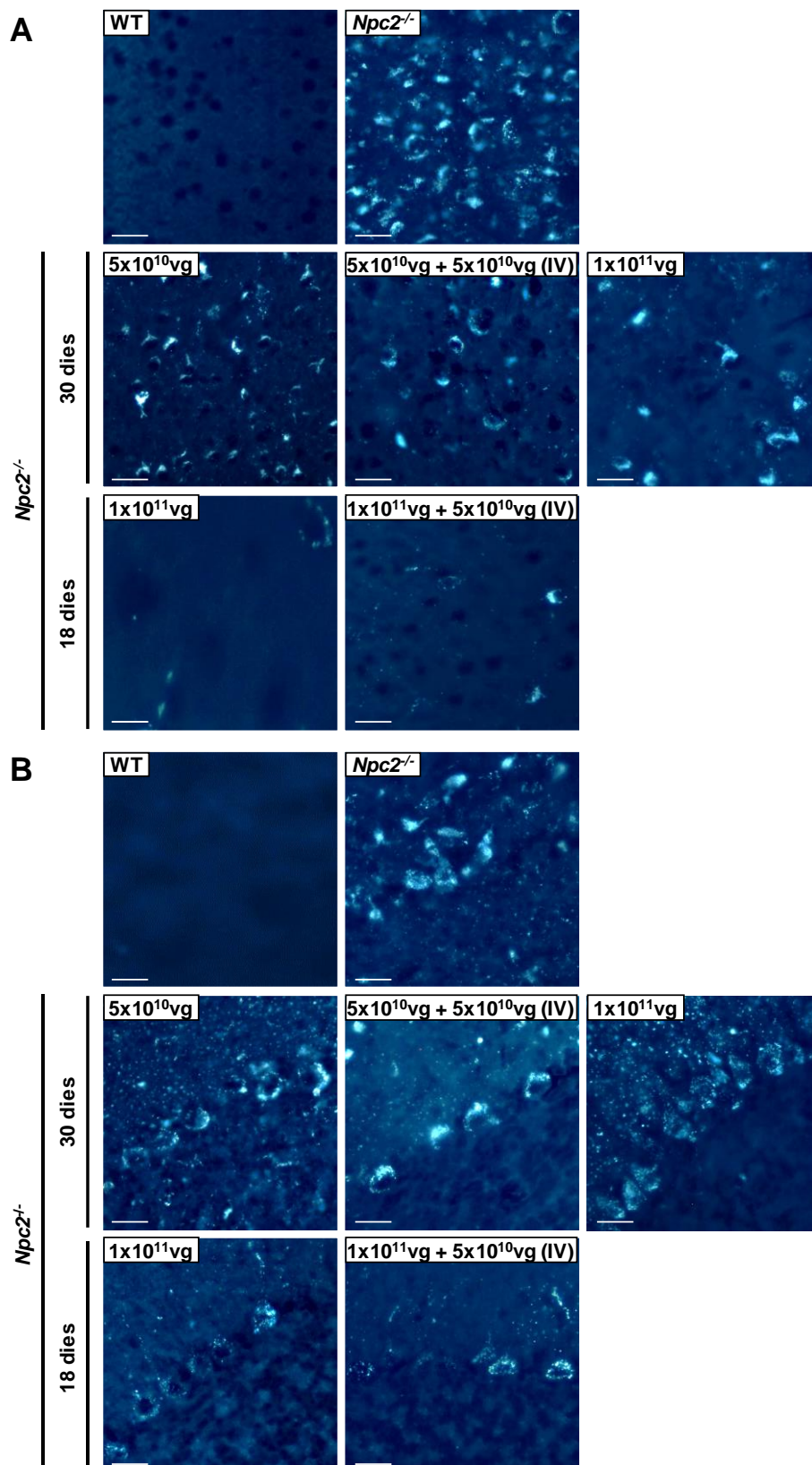
## 4. EFICÀCIA DEL TRACTAMENT AMB L'AAV9-*Npc2* A LA PATOLOGIA DEL SNC

El SNC és dels teixits més afectats a la malaltia de NPC2 (*Geberhiwot, 2018*). Tal com es va observar a la primera part d'aquesta tesi, el model murí generat per la NPC2 recapitulava les principals alteracions patològiques del SNC observades a la malaltia humana, com ara l'acumulació de colesterol, la distensió lisosòmica, la mort de les cèl·lules de Purkinje, la neuroinflamació i la hipomielinització. Per tant, es va analitzar l'efecte del tractament amb el vector AAV9-*Npc2* a ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> mitjançant diverses tècniques immunohistoquímiques i bioquímiques, així com també l'anàlisi de determinades proteïnes i els estudis d'expressió gènica.

### 4.1. Reducció de l'acumulació de colesterol no esterificat

L'efecte de l'administració del vector AAV9-*Npc2* a l'acumulació de colesterol no esterificat a l'encèfal dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> es va caracteritzar mitjançant la tinció de filipina. A l'edat de 60 dies, es van analitzar les regions del còrtex parietal i del cerebel de ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2*. Els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats tenien una acumulació de colesterol molt marcada a l'encèfal, totalment absent als ratolins WT (Figura 45). L'administració del tractament als 18 dies d'edat amb les dosis 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) va conduir a una reversió de l'acumulació de colesterol, tant en el nombre cèl·lules positives com en la intensitat del marcatge, amb un aspecte molt similar al dels animals WT. En canvi, els ratolins que van ser tractats als 30 dies d'edat, és a dir, els que van rebre les dosis 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg, van presentar una reducció evident però menys dràstica. L'eficàcia terapèutica als ratolins que van rebre la dosi 1x10<sup>11</sup>vg va ser superior a la dosi 5x10<sup>10</sup>vg i no es va observar cap efecte addicional a causa de l'administració intravenosa (Figura 45).

Comparativament, la reversió de l'acumulació de colesterol va ser major al còrtex parietal (Figura 45A) que al cerebel (Figura 45B). Amb el tractament amb AAV9-*Npc2*, el marcatge al cerebel estava molt limitat a la capa de les cèl·lules de Purkinje i a la molecular, on hi ha les dendrites de les cèl·lules de Purkinje, mentre que estava majoritàriament absent a la capa granular (Figura 45B). Aquests resultats eren esperables a causa de la major afectació de les cèl·lules de Purkinje al model murí de la NPC2 i evidenciaven la importància de l'administració del tractament a edats primerenques per tal d'assolir una major eficàcia terapèutica.



**Figura 45. Reducció de l'acumulació de colesterol no esterificat a l'encèfal mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** (A,B) Estudi de l'acumulació de colesterol no esterificat mitjançant la tinció de filipina als talls histològics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Imatges representatives del còrtex parietal (A) i del cerebel (B) de 2-5 animals per grup. Barra d'escala: 25 µm.

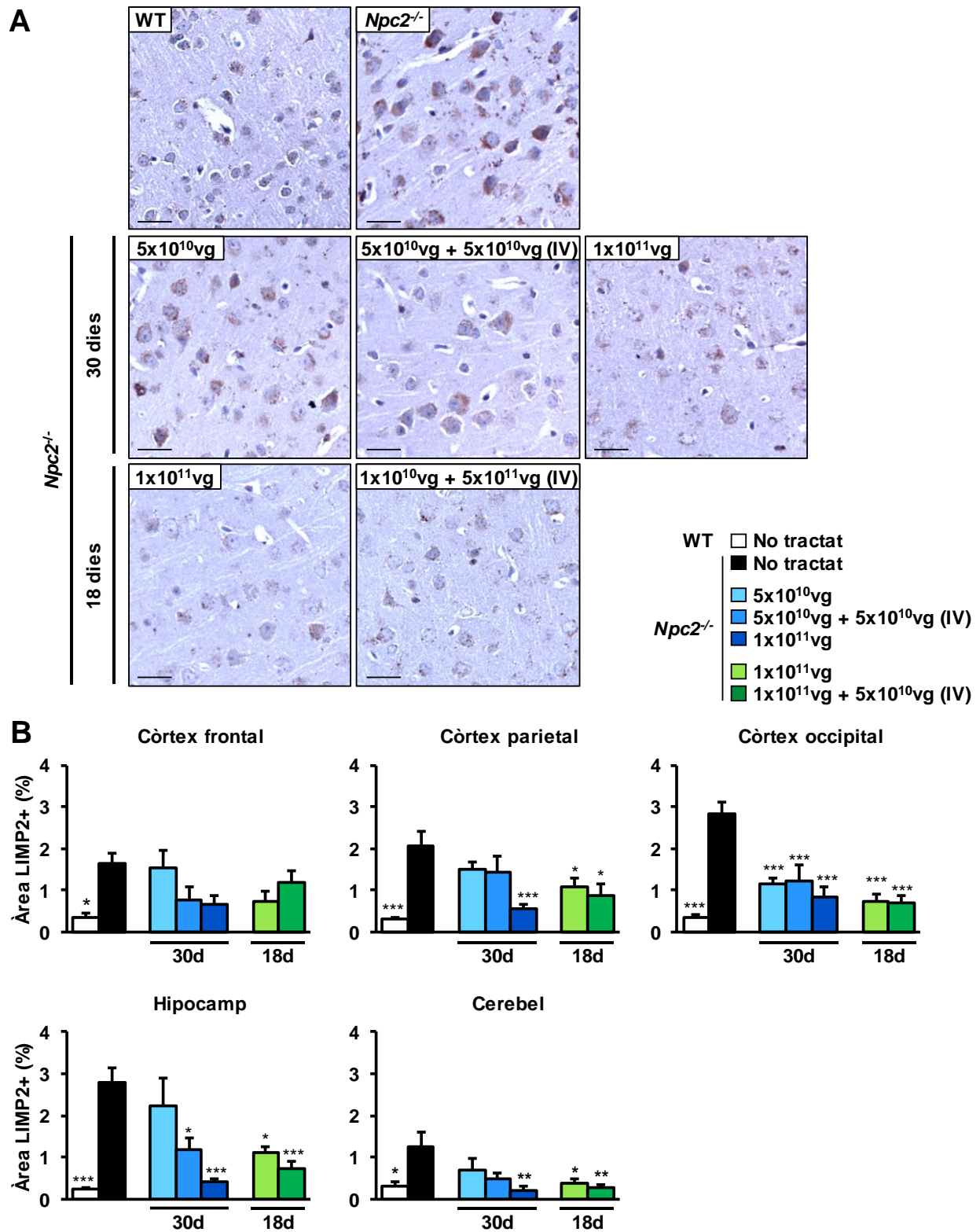


## 4.2. Homeòstasi lisosòmica

El compartiment lisosòmic participa en diverses funcions cel·lulars, com ara la degradació de macromolècules amb els enzims que conté, o el reciclatge d'òrgànuls mitjançant el procés d'autofàgia. L'alteració d'aquest conjunt de funcions provoquen la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica.

### 4.2.1. Distensió lisosòmica

Com que un dels efectes de l'acumulació de colesterol no esterificat produïda per la deficiència de la proteïna NPC2 al model murí era la distensió lisosòmica, es va analitzar si l'administració del vector AAV9-*Npc2* als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> permetia la correcció d'aquest paràmetre. Així doncs, es va dur a terme una immunohistoquímica contra el marcador lisosòmic LIMP2 als talls histològics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb diferents dosis i vies d'administració del vector AAV9-*Npc2* i es van analitzar a 60 dies d'edat. Tal com s'esperava, els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van tenir un marcat augment del senyal positiu de LIMP2 respecte als animals WT, evidenciant la presència de la distensió lisosòmica prèviament observada al model murí de la NPC2 (Figura 46). En general, es va observar una major eficàcia terapèutica als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> que van rebre la dosi alta intracisterna, és a dir, els que van ser tractats a 30 dies d'edat amb  $1 \times 10^{11}$ vg i els que van ser injectats a 18 dies amb  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) (Figura 46). Aquests animals van mostrar la major reducció del senyal positiu de LIMP2 al còrtex, l'hipocamp i el cerebel. En canvi, els ratolins administrats amb el vector als 30 dies d'edat amb la dosi baixa intracisterna, és a dir, els que van rebre  $5 \times 10^{10}$ vg o  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV), només van presentar una correcció parcial. No es va observar un efecte associat a l'edat de tractament, ja que tant els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb la dosi  $1 \times 10^{11}$ vg als 30 dies com els tractats a 18 dies d'edat van mostrar una reducció de la distensió lisosòmica molt similar (Figura 46). L'administració intravenosa d'una part del vector tampoc va contribuir a augmentar l'eficàcia terapèutica. En conjunt, aquests resultats indicaven que la distensió lisosòmica era una alteració patològica que presentava un clar efecte dosi-resposta.

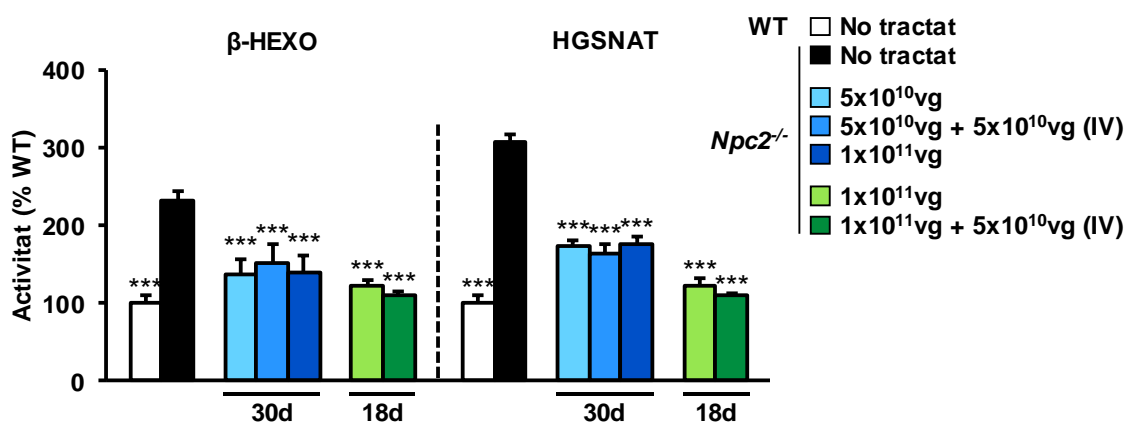


**Figura 46. Reducció de la distensió lisosòmica a l'encèfal mitjançant el tractament amb el vector AAV9-*Npc2*.** Anàlisi de la distensió lisosòmica mitjançant la immunohistoquímica contra LIMP2, un marcador dels lisosomes, als talls histològics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. **(A)** Imatges representatives de la immunohistoquímica al còrtex parietal. Barra d'escala: 25 µm. **(B)** Quantificació de l'àrea positiva de LIMP2. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

#### 4.2.2. Desregulació enzimàtica

L'alteració de l'homeòstasi lisosòmica es va estudiar mitjançant la determinació de l'activitat dels enzims lisosòmics  $\beta$ -HEXO i HGSNAT als extractes proteics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a les següents dosis del vector AAV9-*Npc2*:  $5 \times 10^{10}$ vg,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) i  $1 \times 10^{11}$ vg injectats a 30 dies d'edat;  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) injectats a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat (Figura 47). Mentre que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van presentar un increment de l'activitat  $\beta$ -HEXO de més del 200% respecte als animals WT, el tractament amb el vector AAV9-*Npc2* va resultar en una correcció completa a tots els grups de tractament, independentment de la dosi administrada, la via d'administració utilitzada i l'edat d'injecció (Figura 47). En el cas de l'activitat HGSNAT, l'augment del 300% de l'activitat HGSNAT als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats estava normalitzat als animals tractats a 18 dies d'edat, amb uns valors d'activitat indistingibles dels ratolins WT (Figura 47). En canvi, els ratolins tractats a 30 dies només presentaven una reducció del 60% de l'activitat HGSNAT (Figura 47).

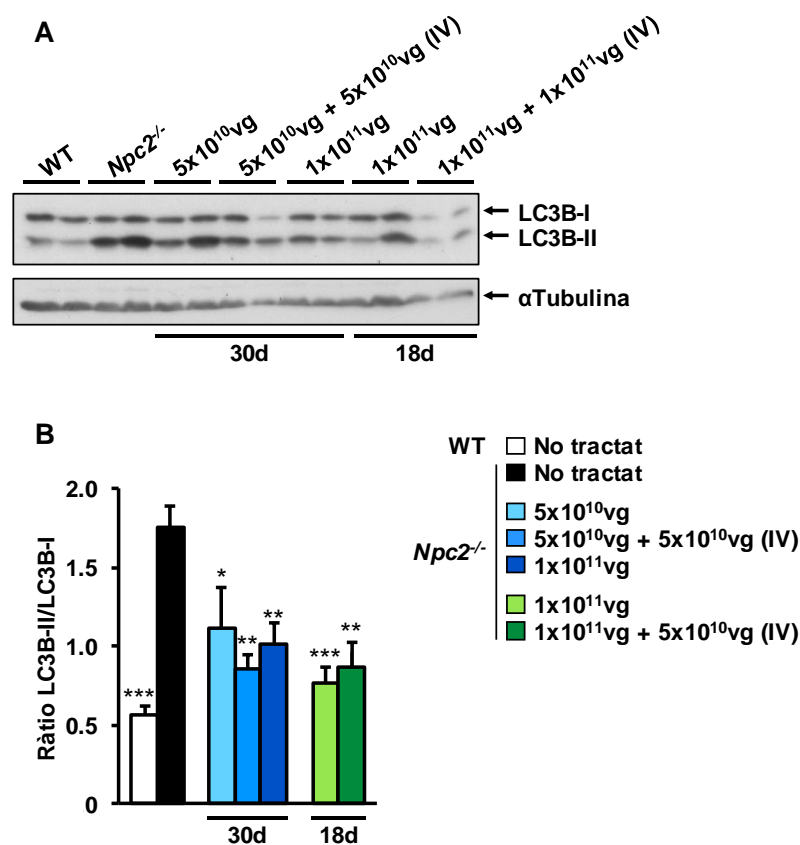
La correcció de la desregulació enzimàtica al model murí de la NPC2 era més evident quan els animals eren tractats a edats més primerenques (18 dies d'edat), però no es va observar un efecte de la via d'administració o la dosi utilitzada en l'eficàcia terapèutica.



**Figura 47. Recuperació de l'homeòstasi del lisosoma mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Determinació de l'activitat enzimàtica  $\beta$ -HEXO i HGSNAT als extractes proteics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis:  $5 \times 10^{10}$ vg,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) i  $1 \times 10^{11}$ vg a 30 dies d'edat;  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

### 4.2.3. Defectes de l'autofàgia

Per tal de comprovar que l'expressió de la proteïna NPC2 produïda per l'administració del vector AAV9-*Npc2* conduïa a la normalització de la patologia lisosòmica, es va analitzar el flux autofàgic a l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* a les següents dosis i vies d'administració: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg injectats a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) injectats a 18 dies d'edat, i analitzats als 60 dies d'edat (Figura 48). Per a mesurar el flux autofàgic, es va analitzar el marcador LC3B per *Western blot* i es va quantificar la ràtio LC3B-II/LC3B-I. L'increment de la ràtio LC3B-II/LC3B-I observat als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats, indicatiu d'una alteració del flux autofàgic, es va reduir de forma significativa a tots els grups de tractament fins a nivells propers als dels animals WT, independentment de l'edat d'injecció, la dosi administrada i la via d'administració utilitzada (Figura 48).



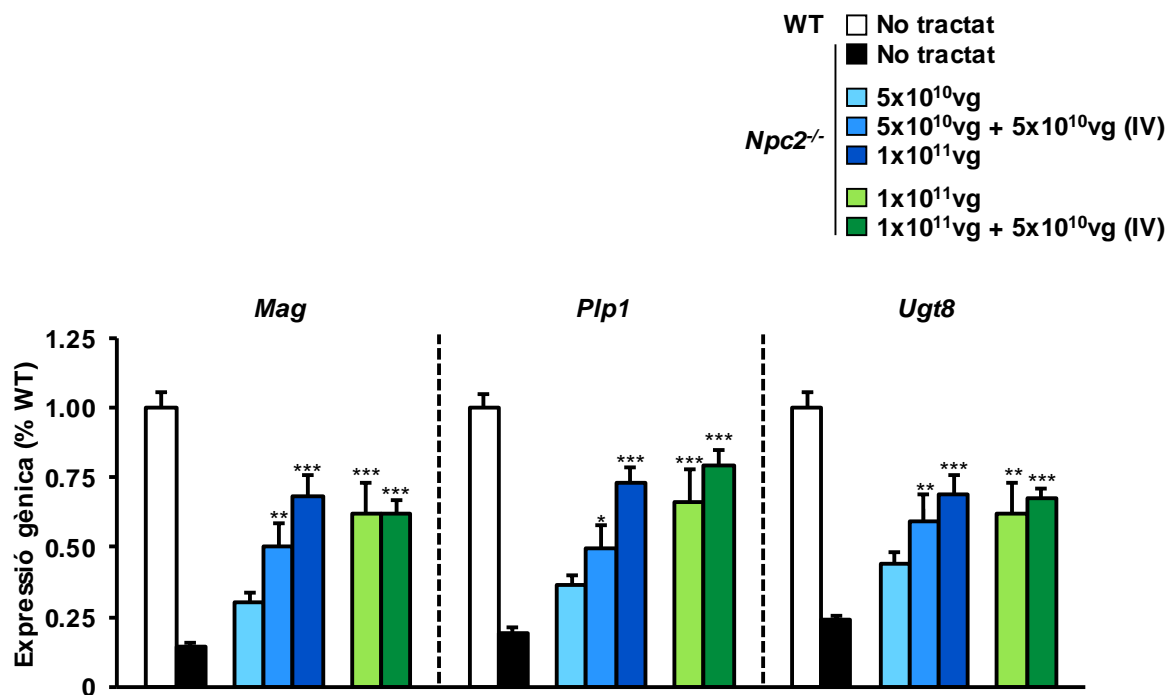
**Figura 48. Millora del flux autofàgic mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Anàlisi del flux autofàgic mitjançant la detecció del marcador LC3B per *Western blot* a l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. **(A)** Imatge representativa d'una membrana de *Western blot* contra LC3B i αTubulina (control de càrrega). **(B)** Quantificació de la ràtio LC3B-II/LC3B-I de 3 membranes independents de *Western blot*. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

#### 4.3. Desmielinització

Com que el model NPC2 va presentar defectes de la maduració dels oligodendròcits i del procés de mielinització als 60 dies d'edat, es va analitzar si l'administració del vector AAV9-*Npc2* era capaç de corregir-ho. Així doncs, es va analitzar l'expressió dels gens *Mag* i *Plp1*, que codifiquen per proteïnes estructurals de la mielina, i *Ugt8*, un enzim que participa en la síntesi dels sulfàtids (uns glicolípidis estructurals de la mielina), als ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* a les següents dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg injectats a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) injectats a 18 dies d'edat.

El tractament amb l'AAV9-*Npc2* va donar lloc a un increment de l'expressió d'aquests marcadors involucrats en la mielinització a tots els grups de tractament (Figura 49). En general, els ratolins tractats amb la dosi alta intracisterna, és a dir, 1x10<sup>11</sup>vg als 30 dies d'edat i 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) als 18 dies, van assolir els nivells d'expressió més elevats, propers al 60-75% dels valors dels animals WT (Figura 49). En canvi, als ratolins tractats amb la dosi baixa intracisterna als 30 dies d'edat, és a dir, 5·10<sup>10</sup> vg i 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV), es va observar una recuperació inferior de l'expressió d'aquests gens. Concretament, els animals tractats 5x10<sup>10</sup>vg van presentar una tendència a l'increment de l'expressió dels gens *Plp1*, *Mag* i *Ugt8*, mentre que els animals tractats 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) van recuperar l'expressió d'aquests gens fins al 50% dels valors dels animals WT (Figura 49).

Així doncs, aquests resultats indicaven que la dosi intracisterna era el factor que afectava més en l'eficàcia terapèutica d'aquest paràmetre, mentre que l'edat d'administració del tractament o la co-administració per via intravenosa no van aportar cap benefici evident.



**Figura 49. Increment de la mielinització mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Quantificació per qPCR dels nivells d'expressió dels gens *Mag*, *Plp1* i *Ugt8* a les mostres d'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

#### 4.4. Patologia del cerebel

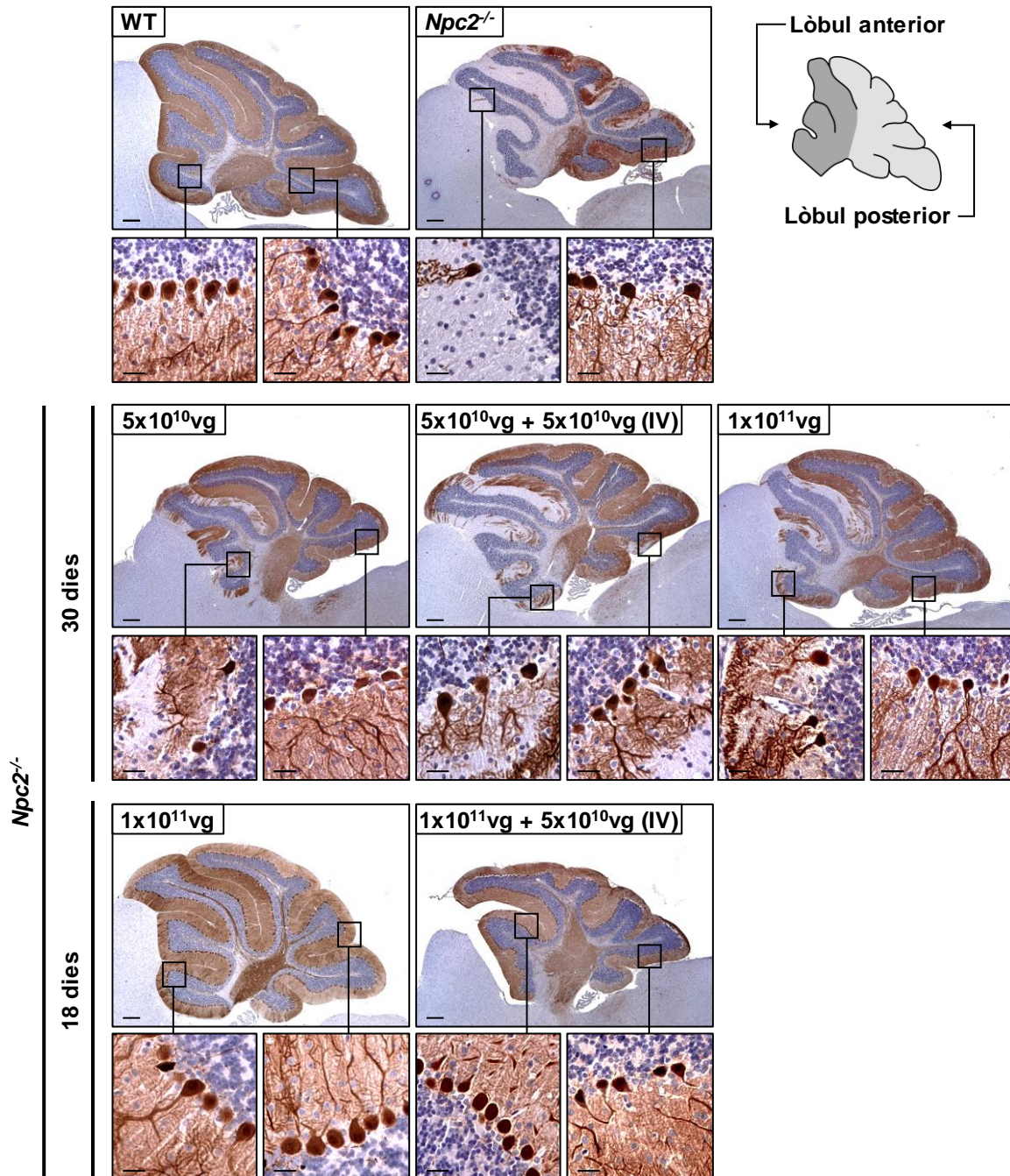
Un dels efectes més rellevants de la deleció del gen *Npc2* i de l'acumulació de colesterol al compartiment lisosòmic al model murí de la NPC2 va ser la mort progressiva de les cèl·lules de Purkinje. Per tal de determinar si l'administració del vector AAV9-*Npc2* als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> donava lloc a l'estabilització de la densitat de les cèl·lules de Purkinje, es va realitzar una immunohistoquímica contra Calbindina D28k, un marcador de cèl·lules de Purkinje, als 60 dies d'edat al cerebel dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2*. La quantificació del nombre de cèl·lules amb tinció positiva per a Calbindina D28k va evidenciar que els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats presentaven una marcada reducció del nombre de cèl·lules de Purkinje, corresponent al 2.5% dels valors del WT al lòbul anterior i al 26.7%, al lòbul posterior del cerebel (Figura 50 i Figura 51). En canvi, tant el lòbul anterior com el posterior dels animals administrats a l'edat de 30 dies van preservar una millora parcial de la densitat de les cèl·lules de Purkinje, tot i que no era estadísticament significativa respecte als animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats. Al lòbul anterior i posterior, respectivament, els ratolins tractats a 30 dies d'edat a la dosi 5x10<sup>10</sup>vg van assolir una densitat del 35.7% i

del 49.8% dels valors dels animals WT; als tractats amb  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) es van observar uns valors del 10.8% i del 47%; i als  $1 \times 10^{11}$ vg, els valors de densitat obtinguts van ser del 35.8% i 50.6% (Figura 50 i Figura 51). No es va detectar un efecte dosi-resposta, ja que, en aquest cas, es va observar pràcticament el mateix efecte terapèutic entre el grup experimental  $5 \times 10^{10}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg, tot i augmentar la dosi de vector AAV9-*Npc2*.

Comparativament, l'eficàcia terapèutica va ser superior als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats als 18 dies d'edat, ja que els administrats amb  $1 \times 10^{11}$ vg presentaven un 54.3% de la densitat de les cèl·lules de Purkinje al lòbul anterior del cerebel i un 90.1%, al lòbul posterior, mentre que els administrats  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) era del 76.5% i 105.4% al lòbul anterior i posterior, respectivament (Figura 50 i Figura 51).

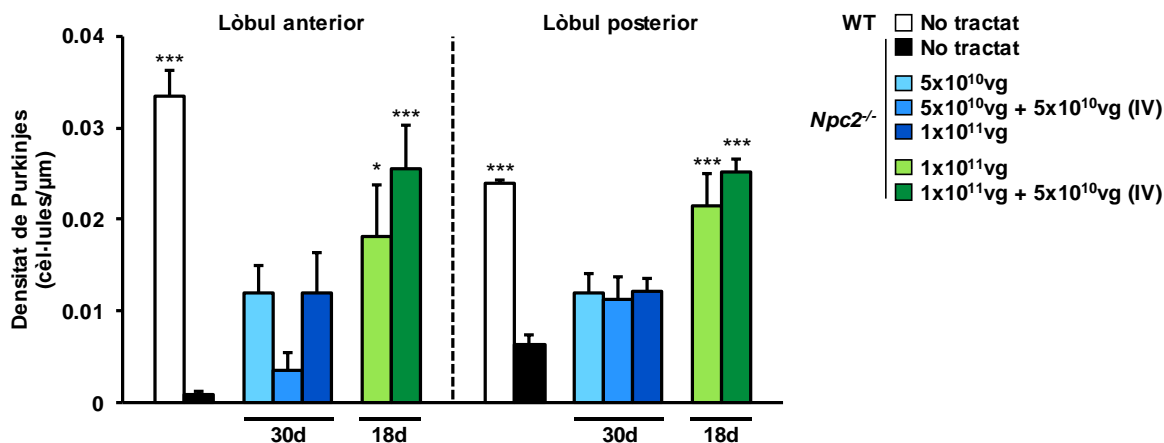
Per tant, aquests resultats demostraven la importància de tractar els animals tan aviat com fos possible a causa de la ràpida progressió de la mort de les cèl·lules de Purkinje, especialment al lòbul anterior. Així doncs, l'edat d'injecció va ser el factor més rellevant en aquest paràmetre.





**Figura 50. Manteniment de la densitat de les cèl·lules de Purkinje mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Imatges representatives de la immunohistoquímica contra la Calbindina D28k, un marcador de les cèl·lules de Purkinje, a les seccions del cerebel dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 500 µm (25 µm a l'ampliació).

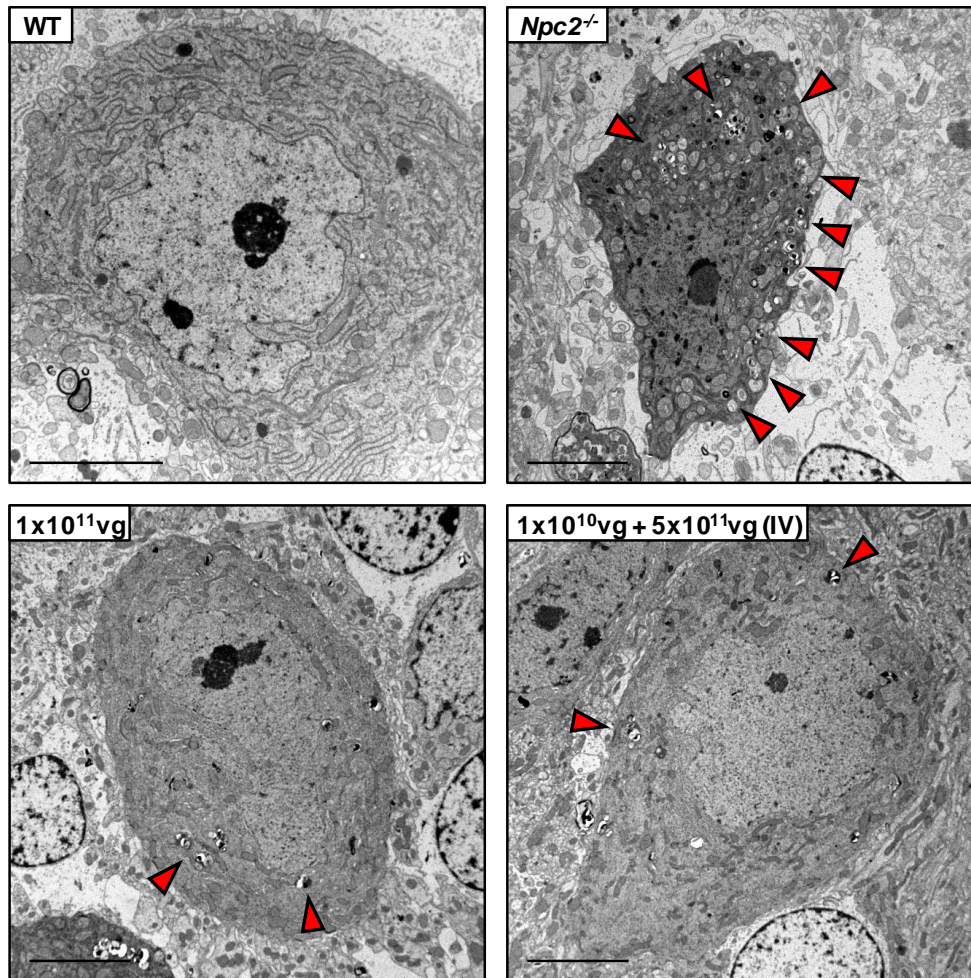




**Figura 51. Quantificació de la densitat de les cèl·lules de Purkinje mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Quantificació de la densitat de cèl·lules de Purkinje al lòbul anterior i posterior del cerebel a la immunohistoquímica contra la Calbindina D28k dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

Per altra banda, també es va caracteritzar l'eficàcia terapèutica del vector AAV9-*Npc2* mitjançant l'anàlisi ultraestructural de les cèl·lules de Purkinje per MET als 60 dies d'edat. L'estudi es va realitzar als ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 18 dies d'edat amb les dosis 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV), les dues dosis amb les que es va preservar la densitat de les cèl·lules de Purkinje de forma estadísticament significativa. Els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van presentar un nombre molt reduït de cèl·lules de Purkinje, amb una morfologia alterada i múltiples vesícules citoplasmàtiques que contenien material electrodens i estructures multilamel·lars, compatibles amb un autofagosoma (Amritraj, 2009; Maass, 2015) (Figura 52). En canvi, 42 dies post-injecció, l'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a una reducció molt marcada del nombre i la mida d'aquestes vesícules (Figura 52). A més a més, les cèl·lules de Purkinje dels animals tractats presentaven una morfologia molt similar a les dels animals WT, als quals només s'hi va observar alguns lisosomes secundaris d'aspecte normal (Figura 52).

Aquests resultats concordaven amb la disminució de l'acumulació de colesterol no esterificat (Figura 45) i del marcatge positiu per LIMP2 (Figura 46), i amb la millora del flux autofàgic (Figura 48), fet que confirmava l'eficàcia terapèutica del vector AAV9-*Npc2* per corregir la patologia de les cèl·lules de Purkinje.



**Figura 52. Reducció de la vacuolització citoplasmàtica a les cèl·lules de Purkinje mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Anàlisi per MET a 60 dies d'edat del cerebel dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 18 dies d'edat amb les dosis  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV). Les fletxes vermelles indiquen vesícules plenes de material electro-dens i estructures multi-lamel·lars. Imatges representatives de 2 animals per grup. Barra d'escala: 5  $\mu$ m.

#### 4.5. Neuroinflamació

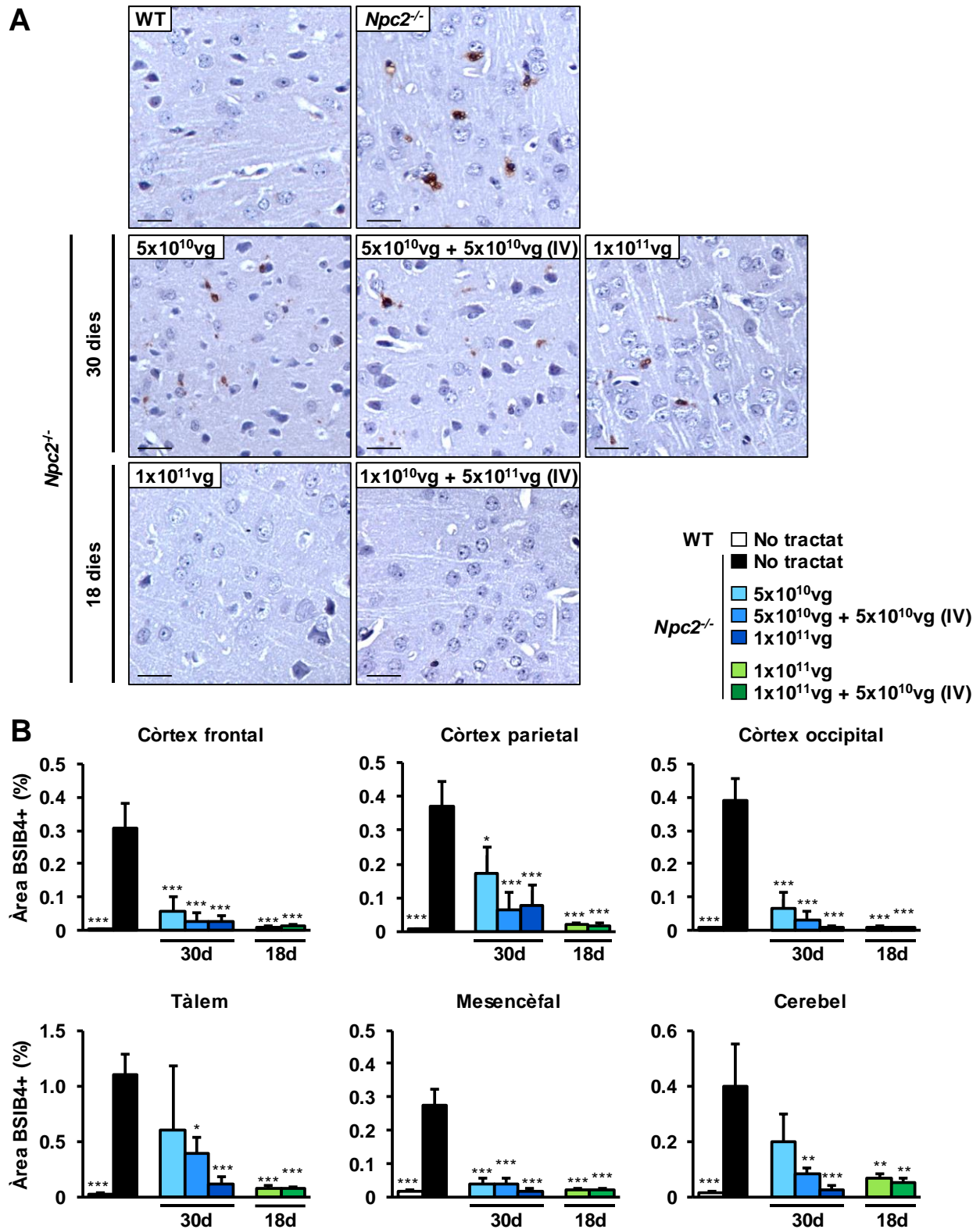
Per a analitzar l'efecte del tractament amb l'AAV9-*Npc2* a la neuroinflamació observada al model murí de la NPC2, es va dur a terme una tinció amb la lectina BSIB4, un marcador de micròglia que amb el nostre protocol marca únicament la micròglia activada, i una immunohistoquímica contra GFAP, un marcador d'activació d'astròcits, a les seccions d'encèfal dels ratolins WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2*.

Als 60 dies d'edat, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar un increment de l'àrea positiva de BSIB4 respecte als animals WT, que confirmava l'activació de la micròglia

prèviament observada al fenotipatge del model murí de la NPC2 (Figura 53). Després de l'administració del vector AAV9-*Npc2* als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>, es va aconseguir un grau de correcció variable de la microgliosi. Els ratolins que van rebre la dosi alta intracisterna, és a dir,  $1 \times 10^{11}$ vg als 30 dies d'edat i  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) als 18 dies d'edat, van presentar un grau de correcció més gran de la microgliosi a totes les regions de l'encèfal analitzades i similars a l'observada als animals WT (Figura 53). No es van observar diferències segons l'edat d'injecció als ratolins administrats amb la dosi alta intracisterna, fet que suggereix que l'edat d'injecció no té un efecte important en aquest paràmetre (Figura 53). En canvi, els animals que van rebre la dosi baixa intracisterna als 30 dies d'edat, és a dir,  $5 \times 10^{10}$ vg i  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV), només van aconseguir una reducció parcial de la microgliosi a la majoria de regions de l'encèfal analitzades (Figura 53). Fins i tot, en el cas de la dosi  $5 \times 10^{10}$ vg a 30 dies d'edat, el tractament amb l'AAV9-*Npc2* no va ser suficient per a revertir la microgliosi de forma significativa al tàlem o al cerebel (Figura 53).

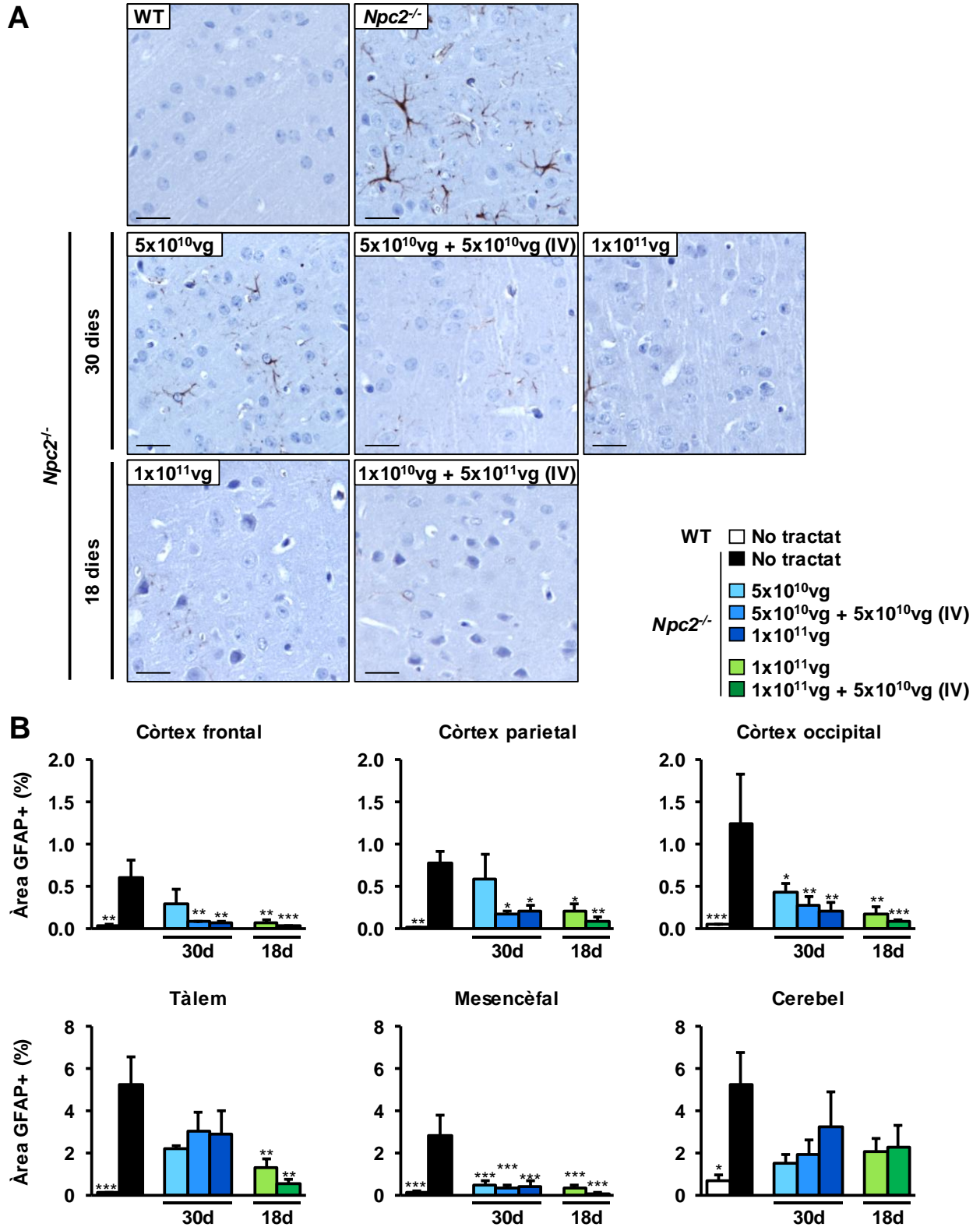
Pel que fa a l'astrocitosi, el grau de correcció després de l'administració del vector AAV9-*Npc2* va ser molt variable en funció de la regió de l'encèfal analitzada (Figura 54). Al còrtex frontal i parietal, es va observar una correcció estadísticament significativa de l'activació dels astròcits a tots els grups de tractament, excepte amb la dosi  $5 \times 10^{10}$ vg administrada als 30 dies d'edat, on només es va observar una tendència a la millora de l'astrocitosi (Figura 54). En canvi, el còrtex occipital va evidenciar una correcció gradual en funció de l'edat d'injecció i la dosi total administrada, és a dir, a més dosi i a edats més primerenques s'observava un major eficàcia terapèutica (Figura 54). El tàlem presentava una reducció estadísticament significativa de l'àrea positiva de GFAP als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 18 dies d'edat ( $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV)) respecte als animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats; i, al mesencèfal, es va observar una correcció total a tots els grups de tractament (Figura 54). Al cerebel, el senyal positiu de GFAP va ser més variable i es va observar una tendència a presentar menys astròcits activats.

El conjunt d'aquests resultats indicaven que el tractament amb l'AAV9-*Npc2* amb les diferents dosis generava una millora o una correcció de la neuroinflamació de forma generalitzada a l'encèfal als 60 dies d'edat, especialment a les dosis altes del vector administrades.



**Figura 53. Reversió de la microgliosi mitjançant el tractament amb el vector AAV9-*Npc2*.** Anàlisi de la microgliosi mitjançant la tinció amb la lectina BSIB4 als talls histològics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. **(A)** Imatges representatives de la tinció al còrtex parietal. Barra d'escala: 25 µm. **(B)** Quantificació de l'àrea positiva de BSIB4. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.





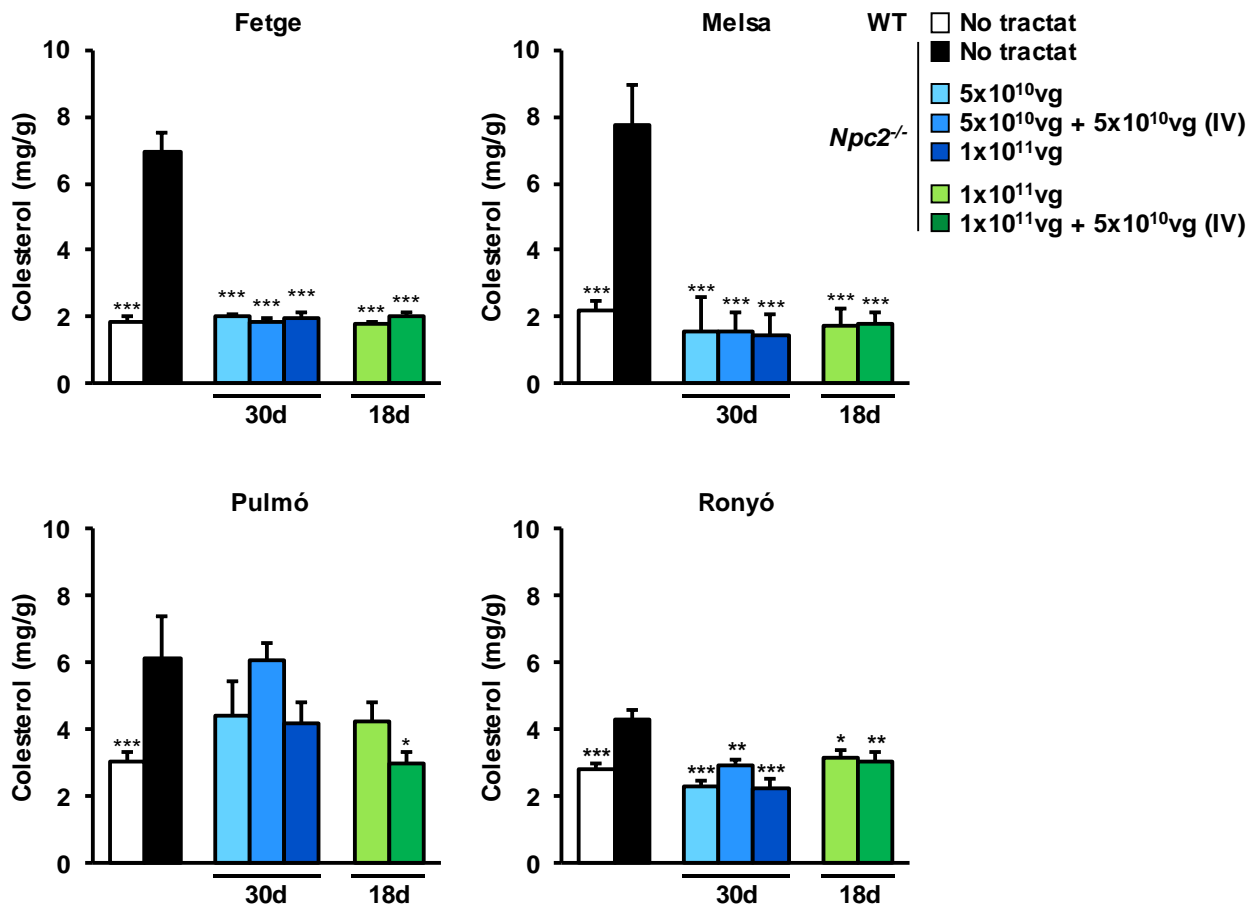
**Figura 54. Reducció de l'astrocitosi mitjançant el tractament amb el vector AAV9-*Npc2*.** Anàlisi de l'astrocitosi mitjançant la immunohistoquímica contra el marcador GFAP als talls histològics de l'encèfal dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. **(A)** Imatges representatives de la immunohistoquímica al còrtex parietal. Barra d'escala: 25 µm. **(B)** Quantificació de l'àrea positiva de GFAP. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 4-5 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

## 5. EFECTE DEL TRACTAMENT AMB L'AAV9-Npc2 A LA PATOLOGIA DELS TEIXITS PERIFÈRICS

### 5.1. Acumulació de colesterol

Per tal d'analitzar l'efecte de l'expressió de la proteïna NPC2 produïda per l'administració del vector viral AAV9-*Npc2* als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>, es va analitzar l'acumulació de colesterol no esterificat als òrgans perifèrics. Així doncs, es va quantificar el colesterol total als extractes lipídics de les mostres de fetge, melsa, pulmó i ronyó dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* a les següents dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg injectats a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) injectats a 18 dies d'edat, i es van analitzar als 60 dies d'edat. Tots els tractaments van aconseguir la normalització de la concentració de colesterol no esterificat al fetge, la melsa i el ronyó (Figura 55). En canvi, el pulmó va ser un teixit més refractari al tractament i només es va observar una completa correcció als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> administrats amb la dosi 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat. Els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> que només van rebre l'administració intracisterna van presentar una tendència similar a la reducció, excepte els animals administrats als 30 dies d'edat a la dosi 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) que no van millorar l'acumulació de colesterol no esterificat al pulmó (Figura 55). Per tant, no es va observar un efecte-dosi resposta o un benefici addicional de l'administració intravenosa al pulmó.

En conjunt, doncs, aquests resultats indicaven que el tractament amb el vector AAV9-*Npc2* conduïa a una millora de l'acumulació del colesterol als teixits perifèrics, independentment de l'edat, la dosi o la via d'administració.



**Figura 55. Reducció de l'acumulació de colesterol als teixits perifèrics mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Quantificació del colesterol total als extractes lipídics del fetge, la melsa, el pulmó i el ronyó dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 5-10 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

## 5.2. Distensió lisosòmica

Com que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> presentaven la distensió lisosòmica associada a l'acumulació de colesterol no esterificat, es va analitzar si la correcció de l'acumulació de colesterol observada als teixits perifèrics com a conseqüència del tractament amb el vector AAV9-*Npc2* era suficient per revertir la distensió lisosòmica. Es va dur a terme una immunohistoquímica contra LIMP2, un marcador de lisosomes, a les seccions del fetge, la melsa i el pulmó, els principals òrgans afectats a la malaltia de NPC2. Els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar un augment del senyal positiu de LIMP2. En canvi, l'administració del vector AAV9-*Npc2* a qualsevol de les dosis, edat i vies d'administració

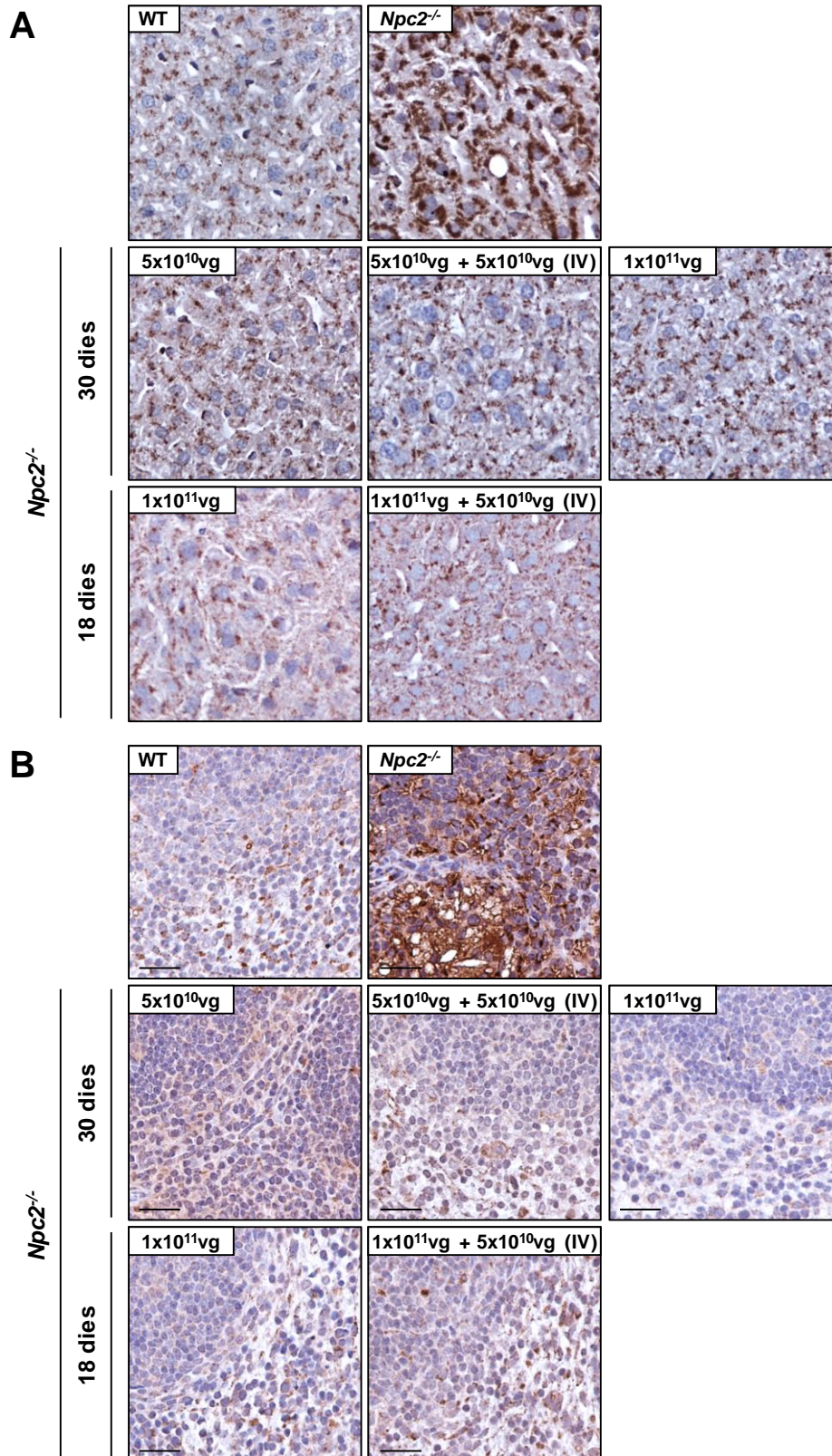
---

va conduir a una normalització de la distensió lisosòmica tant al fetge com a la melsa, amb un aspecte indistingible al dels ratolins WT (Figura 56).

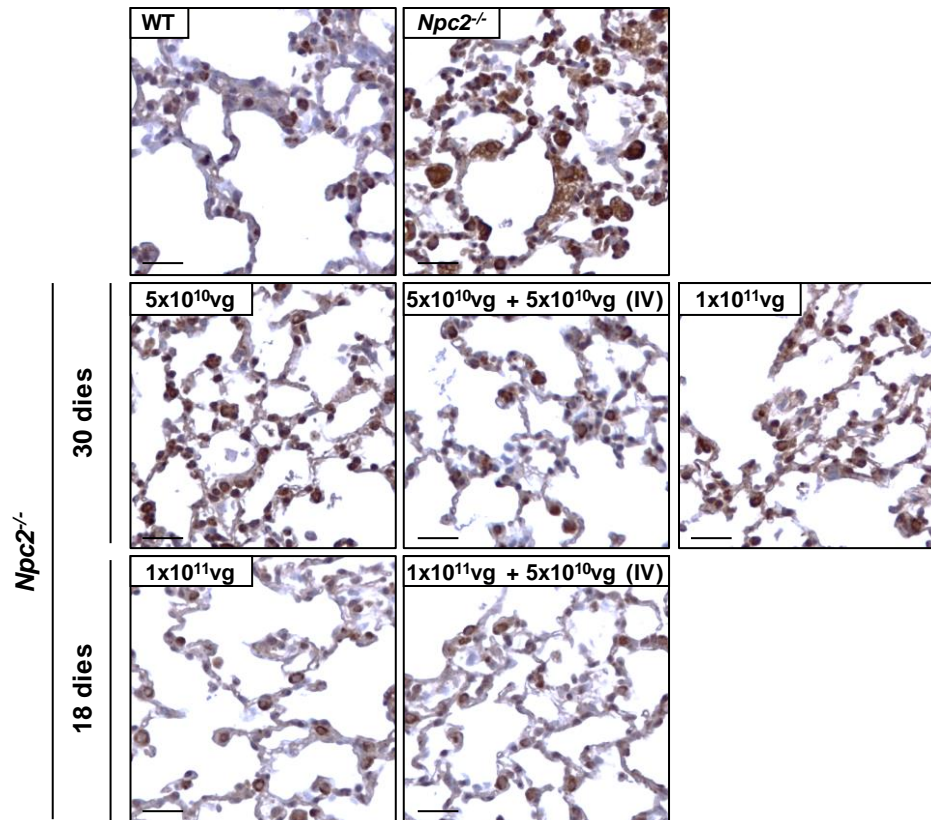
Al pulmó, de forma similar a l'acumulació de colesterol no esterificat, la reducció del senyal positiu de LIMP2 va ser parcial a tots els grups de tractament amb el vector viral AAV9-*Npc2* (Figura 57). Els ratolins administrats a 18 dies d'edat, és a dir, els que van rebre la dosi  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV), van presentar un senyal positiu menor a la dels ratolins tractats a 30 dies d'edat, és a dir,  $5 \times 10^{10}$ vg,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) i  $1 \times 10^{11}$ vg (Figura 57). En canvi, la dosi i la via d'administració no van modificar de forma evident l'eficàcia terapèutica.

En general, aquests resultats demostraven que l'administració del vector viral AAV9-*Npc2* a edats més primerenques (18 dies d'edat) era capaç de corregir de forma més eficaç la distensió lisosòmica als teixits perifèrics, específicament al pulmó, un òrgan més refractari al tractament.





**Figura 56. Normalització de la distensió lisosòmica al fetge i la melsa mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** La distensió lisosòmica es va analitzar per immunohistoquímica contra LIMP2, un marcador de lisosomes, a les seccions del fetge i la melsa dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 25 µm.



**Figura 57. Disminució de la distensió lisosòmica al pulmó mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** La distensió lisosòmica es va analitzar per immunohistoquímica contra LIMP2, un marcador de lisosomes, a les seccions del pulmó dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 25 µm.

### 5.3. Inflamació als teixits perifèrics

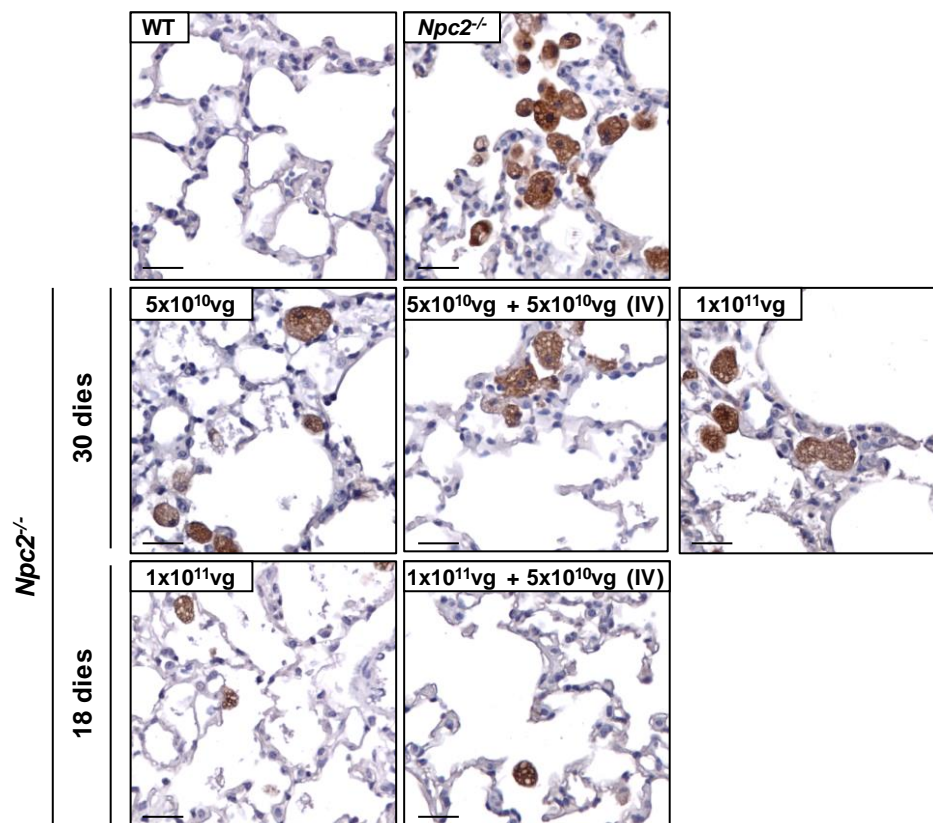
Al fenotipatge del model murí de la NPC2, es va observar la presència de macròfags activats als teixits perifèrics. Per tal d'analitzar si el tractament amb el vector viral AAV9-*Npc2* donava lloc a una disminució de la inflamació, es va dur a terme una immunohistoquímica contra el marcador d'activació de macròfags, Mac-2, a les seccions del fetge, la melsa i el pulmó. Coincidint amb els resultats obtinguts al fenotipatge, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar un increment del nombre de cèl·lules positives per Mac-2, indicant la presència de macròfags activats en aquests teixits perifèrics analitzats (Figura 58). En canvi, els ratolins tractats amb el vector AAV9-*Npc2* no van presentar senyal positiu de Mac-2 i l'aspecte del fetge i la melsa era totalment indistingible del dels animals WT (Figura 58).





En concordança amb els resultats de la distensió lisosòmica i de l'acumulació de colesterol no esterificat, el pulmó només va mostrar millores parcials de la correcció de la infiltració per part dels macròfags activats (Figura 59). Tot i que tots els ratolins administrats amb el vector viral AAV9-*Npc2* tenien certa presència de cèl·lules amb senyal positiu per Mac-2, els ratolins tractats a 18 dies d'edat, és a dir,  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV), van presentar una gran millora, amb la pràctica absència de cèl·lules positives per Mac-2 en comparació als ratolins tractats als 30 dies d'edat (Figura 59).

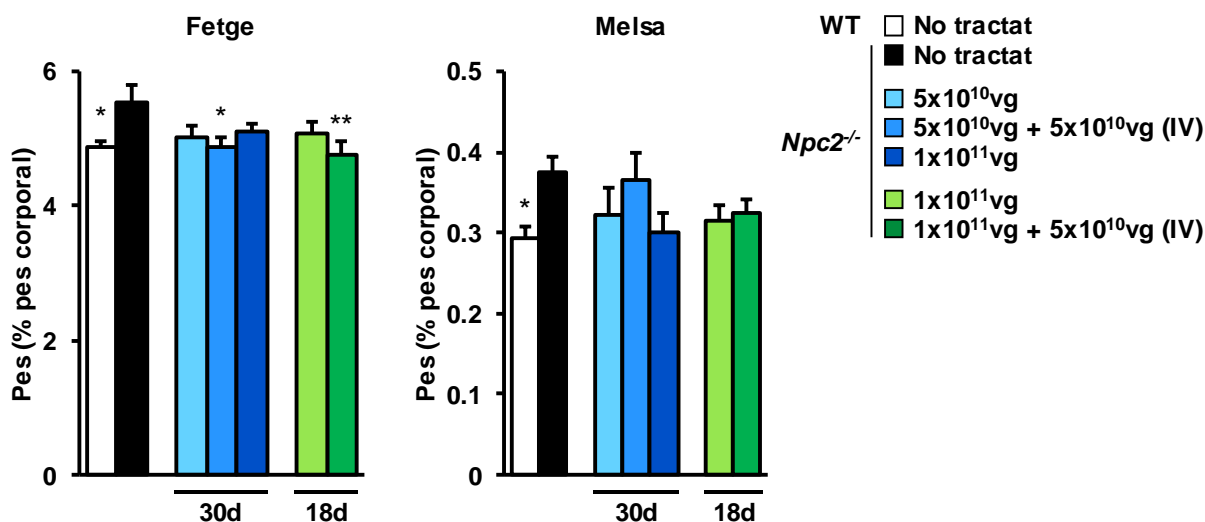
Així doncs, aquests resultats demostraven que l'administració del vector viral AAV9-*Npc2* a edats més primerenques (18 dies d'edat) era més eficaç en la correcció de la inflamació als diferents teixits perifèrics analitzats.



**Figura 59. Correcció de la inflamació al pulmó mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Immunohistoquímica contra Mac-2, un marcador de macròfags activats, a les seccions del pulmó dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis:  $5 \times 10^{10}$ vg,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) i  $1 \times 10^{11}$ vg a 30 dies d'edat;  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Imatges representatives de 5 animals per grup. Barra d'escala: 25  $\mu$ m.

#### 5.4. Hepatosplenomegàlia

L'hepatomegàlia és un dels símptomes més característics del fenotip neonatal i infantil de la malaltia de NPC2 en humans (Vanier, 2010), que també es va observar al model murí de la NPC2. Per tant, es va analitzar l'efecte del tractament amb el vector AAV9-*Npc2* en aquesta alteració patològica. Als 60 dies d'edat, els ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van presentar un increment del pes del fetge relatiu al pes corporal (Figura 60). L'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a la normalització del pes relatiu del fetge assolint els valors dels animals WT als grups que van rebre la dosi intravenosa, és a dir, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) als 30 dies i, especialment, als administrats amb 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) als 18 dies d'edat. En canvi, els animals injectats únicament a la cisterna magna 5x10<sup>10</sup>vg (30d), 1x10<sup>11</sup>vg (30d) i 1x10<sup>11</sup>vg (18d) van tenir una millora parcial de l'hepatomegàlia sense obtenir diferències estadísticament significatives (Figura 60). Pel que fa a la melsa, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van presentar una tendència a l'increment del pes de la melsa relatiu al pes corporal, mentre que els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats tendien a disminuir-ne el pes, excepte els que van rebre la dosi 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) (30d) que van presentar valors més variables. Així doncs, aquests resultats indicaven que l'administració intravenosa del vector terapèutic era necessària per tal de corregir l'hepatomegàlia, sense efectes rellevants de l'edat d'injecció o la dosi intracisterna. En canvi, l'efecte del tractament sobre l'esplenomegàlia va ser més consistent als animals tractats més joves.



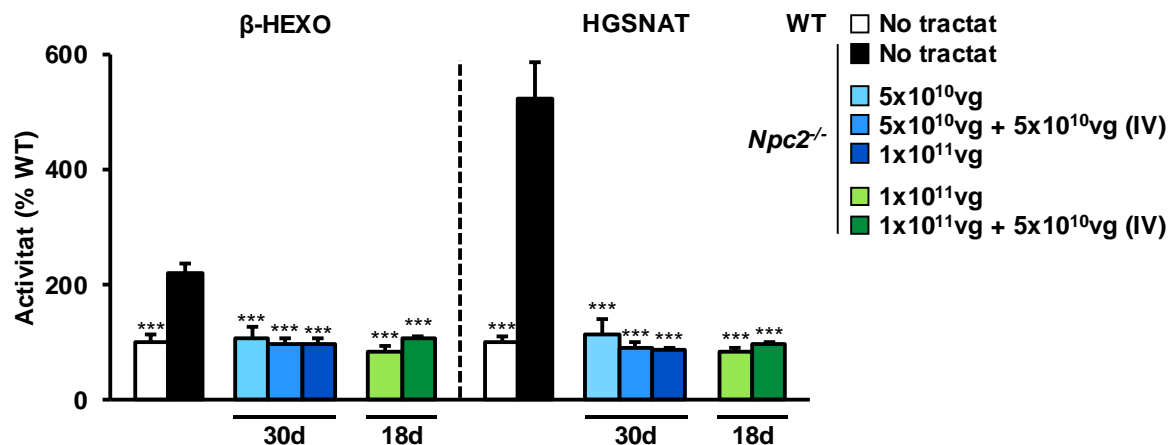
**Figura 60. Reducció de l'hepatoesplenomegàlia mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Anàlisi del pes del fetge i la melsa relatiu al pes corporal als ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 7-16 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

## 5.5. Homeòstasi lisosòmica

### 5.5.1. Enzims lisosòmics al fetge

L'activitat de diversos enzims lisosòmics estava alterada al nostre model murí de la NPC2, provocant la desregulació de l'homeòstasi lisosòmica al fetge. Aleshores, es va mesurar l'activitat dels enzims  $\beta$ -HEXO i HGSNAT a les mostres del fetge per tal de determinar si l'administració del vector AAV9-*Npc2* conduïa a una recuperació de l'homeòstasi lisosòmica a aquest òrgan. Als 60 dies d'edat, els ratolins mascles *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van presentar un increment de l'activitat  $\beta$ -HEXO de 2 vegades del valor dels WT i, en el cas de l'activitat l'HGSNAT, l'augmentar va ser de 5 vegades (Figura 61). Independentment de la dosi, l'edat i la via d'administració, el tractament dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> amb el vector AAV9-*Npc2* va conduir a la correcció d'ambdues activitats, que era totalment indistingible dels valors d'activitat dels animals WT (Figura 61).

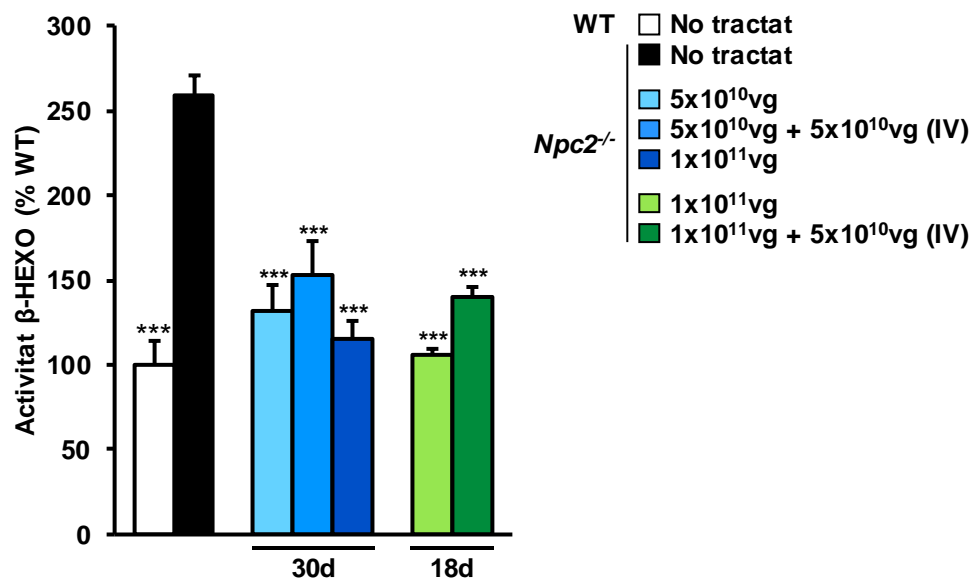
Aquestes dades demostren que l'administració del vector viral AAV9-*Npc2* per via intracisterna a una dosi de  $5 \times 10^{10}$ vg a ratolins afectats per la malaltia NPC2 era suficient per a assolir la màxima eficàcia terapèutica en la desregulació lisosòmica detectada al fetge dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>.



**Figura 61. Normalització de l'homeòstasi lisosòmica al fetge mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Determinació de l'activitat dels enzims HGSNAT i  $\beta$ -HEXO als extractes proteics del fetge dels ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis:  $5 \times 10^{10}$ vg,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) i  $1 \times 10^{11}$ vg a 30 dies d'edat;  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

### 5.5.2. Alteració de l'activitat $\beta$ -HEXO al sèrum

Per altra banda, també es va analitzar l'activitat  $\beta$ -HEXO al sèrum, ja que és un marcador freqüentment alterat a les LSD. A dos mesos d'edat, els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats mostraven un augment de l'activitat d'aquest enzim que era superior al 250% de l'activitat dels animals WT. En canvi, l'administració del vector AAV9-*Npc2* a les diferents dosis, vies d'administració utilitzades o edats de tractament va conduir a una gran disminució i fins i tot normalització dels nivells de  $\beta$ -HEXO circulant respecte als animals no tractats (Figura 62).



**Figura 62. Disminució de l'activitat  $\beta$ -HEXO al sèrum mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** Determinació de l'activitat  $\beta$ -HEXO a les mostres de sèrum dels ratlins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana  $\pm$  SEM de 5 animals per grup. \*\*\*  $p < 0.001$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats (ANOVA d'una via seguida del post-test de Dunnett).



## 6. AVALUACIÓ DEL COMPORTAMENT

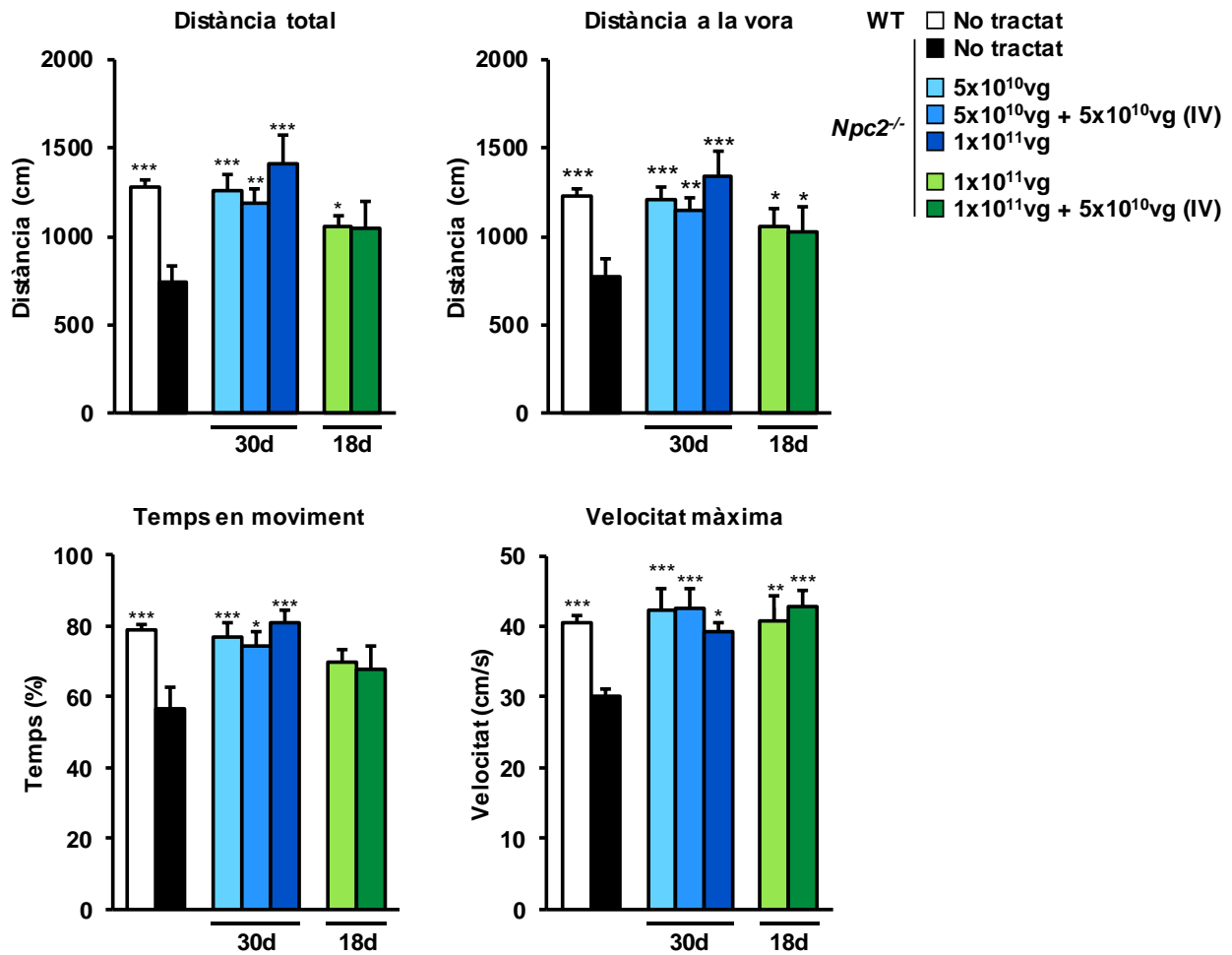
A la caracterització del model murí de la NPC2 es va observar que la deleció del gen *Npc2*<sup>-/-</sup> provocava problemes motors en forma d'una disminució de l'activitat locomotora i de la coordinació. Així doncs, es va analitzar si l'administració del vector AAV9-*Npc2* era capaç de corregir aquestes alteracions del comportament.

### 6.1. Prova de l'actímetre

La prova de l'actímetre es va realitzar als 60 dies d'edat als ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* a les següents dosis:  $5 \times 10^{10}$ vg,  $5 \times 10^{10}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) i  $1 \times 10^{11}$ vg injectats a 30 dies d'edat;  $1 \times 10^{11}$ vg i  $1 \times 10^{11}$ vg +  $5 \times 10^{10}$ vg (IV) injectats a 18 dies d'edat. De manera similar al fenotipatge, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van presentar dèficits del comportament locomotor en forma d'una reducció del desplaçament total i a la vora de l'actímetre, un menor temps en moviment i una disminució de la velocitat màxima de desplaçament (Figura 63). En canvi, l'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a una millora o correcció d'aquests paràmetres assolint valors comparables als dels animals WT (Figura 63). En conjunt, no es va observar una relació directa entre l'edat d'administració, la dosi o la via d'administració del vector AAV9-*Npc2* i l'eficàcia terapèutica. Únicament en el cas del temps en moviment els ratolins administrats a 18 dies d'edat van presentar una tendència a estar augmentat, mentre que els ratolins administrats a 30 dies d'edat van presentar diferències estadísticament significatives (Figura 63).

Per tant, l'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a la normalització o millora dels dèficits motors mesurats a la prova de l'actímetre.



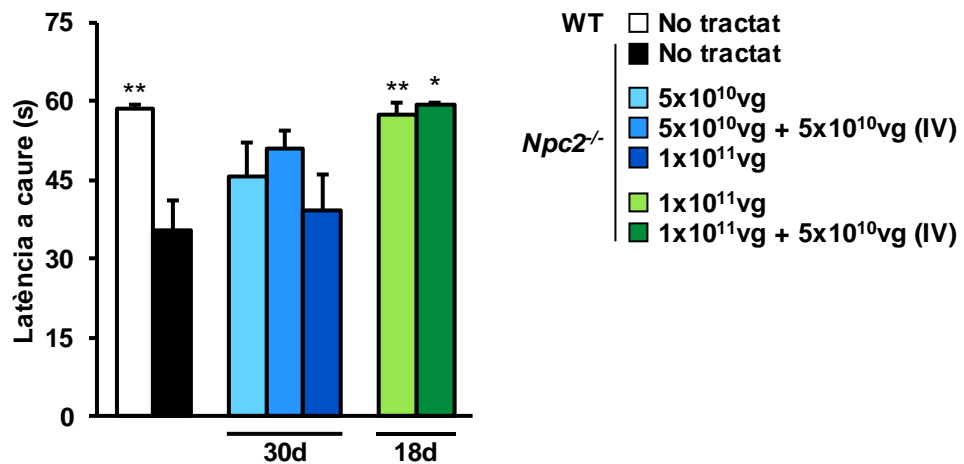


**Figura 63. Millora dels déficits locomotors mitjançant el tractament amb l'AAV9-Npc2.** La prova de l'actímetre es va realitzar als ratolins mascles naïfs pel test dels grups WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 7-29 animals per grup. \* *p*<0.05, \*\* *p*<0.01, \*\*\* *p*<0.001 vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

## 6.2. Prova del *mesh test* i del *rotarod*

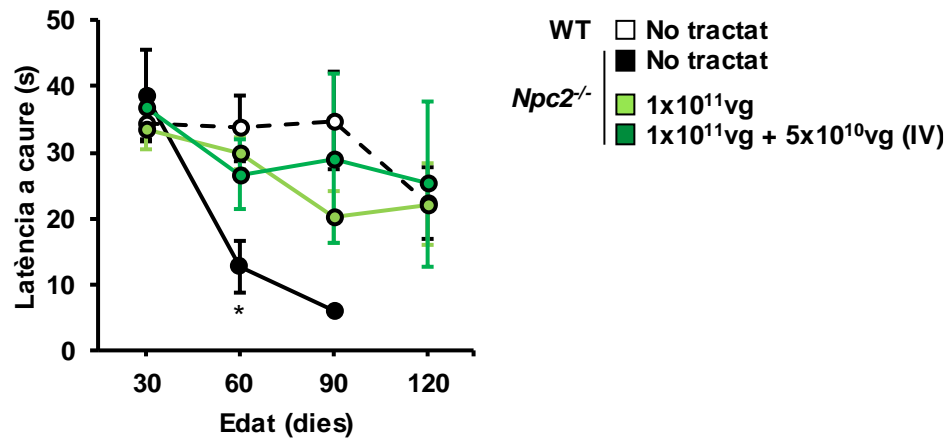
Per a mesurar l'efecte del tractament amb l'AAV9-*Npc2* als problemes de coordinació motora, es va realitzar la prova del *mesh test* i del *rotarod*.

Al *mesh test*, es va observar un efecte lligat a l'edat de tractament. Mentre que els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> administrats amb el vector AAV9-*Npc2* als 30 dies d'edat no van presentar diferències estadístiques en la latència a caure respecte als animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats, els animals que van rebre el tractament als 18 dies d'edat van corregir els problemes de coordinació i es van comportar com els animals WT. Aquesta millora de la coordinació no va dependre de la dosi intracisterna ni de l'administració intravenosa (Figura 64).



**Figura 64. Manteniment de la coordinació mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** La prova del *mesh test* es va realitzar als ratolins mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* per via intracisterna amb les dosis: 5x10<sup>10</sup>vg, 5x10<sup>10</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) i 1x10<sup>11</sup>vg a 30 dies d'edat; 1x10<sup>11</sup>vg i 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV) a 18 dies d'edat i analitzats als 60 dies d'edat. Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 5-14 animals per grup. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

Per altra banda, també es va realitzar la prova del *rotarod*. Com que els ratolins tractats a 30 dies d'edat presentaven únicament una millora parcial dels problemes de coordinació al *mesh test*, aquest estudi només es va realitzar als animals mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats a 18 dies. Als 30 dies d'edat, tots els grups van presentar nivells de coordinació indistingibles (Figura 65). Ara bé, els animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats van manifestar problemes de coordinació als 60 i 90 dies d'edat, ja que van presentar una reducció de la latència a caure del *rotarod*. En canvi, el tractament amb el vector a AAV9-*Npc2* a 18 dies d'edat va permetre mantenir uns nivells de coordinació similars als observats en animals WT a totes les edats analitzades (Figura 65)



**Figura 65. Manteniment de la coordinació mitjançant el tractament amb l'AAV9-*Npc2*.** La prova del rotarod es va realitzar entre els 1 i 4 mesos d'edat als animals mascles WT, *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats i *Npc2*<sup>-/-</sup> tractats amb el vector AAV9-*Npc2* a 18 dies d'edat per via intracisterna amb les dosis: 1x10<sup>11</sup>vg + 5x10<sup>10</sup>vg (IV). Els valors es mostren com a la mitjana ± SEM de 6-19 animals per grup. \*  $p < 0.05$  vs. *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats.

En conjunt, aquests resultats indicaven la importància de tractar els ratolins per via intracisterna a edats joves a causa de la major severitat dels símptomes al SNC en comparació als teixits perifèrics. Així doncs, l'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a la normalització o recuperació dels diversos processos patològics característics de la malaltia de la NPC2, tant al sistema nerviós central com als òrgans i teixits perifèrics, així com una millora del comportament i la supervivència.

## ***V. Discussió***



La NPC2 és una malaltia d'acumulació lisosòmica provocada per la deficiència de la proteïna NPC2, implicada en el transport del colesterol al compartiment endo-lisosòmic. Es tracta d'una malaltia monogènica d'herència autosòmica recessiva amb una incidència d'aproximadament 1:2.000.000 naixements. Es caracteritza per una afectació severa del SNC i una patologia dels teixits perifèrics relativament més lleu. La presentació fenotípica és força variable, però acostuma a incloure atàxia cerebel·losa, cataplexia, disàrtria, disfàgia, paràlisi visual supranuclear i atacs epilèptics. Tot i que els signes i símptomes clínics d'aquesta malaltia es poden desenvolupar des del naixement fins a l'edat adulta, l'esperança de vida acostuma a ser d'entre els 10 i 25 anys (*Vanier, 2010; Bianconi, 2019*). Actualment, només es disposa d'un tractament aprovat per a la NPC2, el miglustat (*Zavesca®*) (*Pineda, 2019*). Tot i els avenços farmacològics i la millora dels tractaments simptomàtics no s'ha aconseguit augmentar l'esperança de vida dels fenotips més tardans (*Bianconi, 2019*). Per tant, el tractament efectiu per contrarestar la patologia de la NPC2 encara és una necessitat mèdica no resolta, fet que fa necessari el desenvolupament de noves estratègies terapèutiques més eficaces i perdurables a llarg termini. La teràpia gènica *in vivo* basada en l'administració dels vectors AAV suposa una alternativa molt prometedora. Una única administració dels vectors AAV permet l'expressió de la proteïna terapèutica a llarg termini de forma segura (*Buchlis, 2012; Bainbridge, 2015; George, 2020*) i, per tant, té el potencial per a ser un tractament curatiu. Així doncs, l'objectiu principal d'aquesta tesi doctoral va ser el desenvolupament d'una aproximació de teràpia gènica *in vivo* per al tractament de la malaltia de Niemann-Pick tipus C2 mitjançant l'administració d'un vector AAV codificant per la proteïna NPC2 en un nou ratolí model de la malaltia.

La mutació més prevalent als pacients de NPC2 és la p.E20X, una mutació que impedeix la síntesi proteica endògena. Així doncs, per tal de desenvolupar una aproximació de teràpia gènica en un context més similar al dels pacients humans, aplicable tant als pacients que no expressen la proteïna com als que en tenen una expressió residual, es va decidir desenvolupar un nou ratolí KO per al gen *Npc2* que no presentava expressió residual de la proteïna.

Com que es tractava d'un nou model, el primer objectiu d'aquesta tesi doctoral va consistir en la seva caracterització fenotípica. El ratolí model de la NPC2 recapitulava les característiques principals de la malaltia dels pacients humans (*Vanier, 2010*). Als 15 dies d'edat, la patologia ja estava ben establerta i es caracteritzava principalment per l'acumulació del colesterol, la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica, la hipomielinització i la inflamació dels diversos teixits. Aquest fenotip de la malaltia es va exacerbar als 30 dies d'edat amb l'inici de la mort de les cèl·lules de Purkinje. La severitat de la patologia

als 15 dies d'edat, juntament amb l'observació d'una proporció sub-mendeliana del genotip *Npc2*<sup>-/-</sup> i problemes del creixement evidents a les 6 setmanes d'edat, indiquen que segurament el model ja presentava alteracions des del naixement. Pel que fa al comportament, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> de 30 dies d'edat ja presentaven una disminució de l'activitat locomotora i una marxa atàxica combinada amb dèficits de coordinació. .

Una de les diferències més destacables entre els dos models de ratolí de la NPC2 és la supervivència, on el model hipomorf viu entre 110-135 dies, és a dir, entre un 40 i un 70% més que el nostre model animal, que presenta una mediana de supervivència de 78 dies (*Sleat, 2004; Davidson, 2009; Markmann, 2018*). Aquest increment de la supervivència és coherent amb la progressió més lenta de la patologia observada al model hipomorf (*Sleat, 2004*). En canvi, el model desenvolupat en aquesta tesi doctoral presenta una supervivència molt similar als ratolins KO model de la NPC1, que presenten una evolució de la patologia més severa i agressiva (*Pentchev, 1984; Xie, 2011; Gómez-Grau, 2017*). A més a més, tot i que no es va dur a terme un estudi de la supervivència just abans del deslletament dels ratolins (a les 2-3 setmanes d'edat), es va observar que el percentatge de ratolins homozigots per la mutació a l'edat de deslletament era força menor a l'esperada, indicant que hi havia mort pre o peri-natal. De fet, en diversos ratolins model de la NPC1, s'han descrit problemes de desenvolupament embrionari i letalitat neonatal (*Maue, 2012; Gómez-Grau, 2017; Rodriguez-Gil, 2019*). Contràriament, la proporció de ratolins homozigots per la mutació no està reduïda al model hipomorf de la NPC2 (*Sleat, 2004*), fet que és coherent amb l'inici endarrerit i progressió més lenta de la malaltia en aquest model.

Així doncs, el model murí de la NPC2 generat en aquesta tesi doctoral presentava un desenvolupament de la malaltia molt accelerat, evidenciant un fenotip molt més sever que el que recapitula el model ja existent de la NPC2 (*Sleat, 2004*). A causa de la severitat de la malaltia, molts pacients reben el diagnòstic quan la patologia ja està molt avançada, especialment als fenotips infantils. Per tant, aquest nou model seria útil per a estudiar l'eficàcia terapèutica del tractament en unes condicions més similars als pacients pediàtrics.

Com que el principal teixit afectat a la malaltia de NPC2 és el SNC, l'aproximació terapèutica desenvolupada consisteix en l'administració al LCR d'un vector AAV de serotip 9 codificant per la *Npc2* per al tractament del principal òrgan diana, el SNC, i també la patologia perifèrica. L'avantatge principal de l'administració directament al LCR d'aquests vectors és que permet una major distribució al SNC. En canvi, l'administració al parènquima cerebral, que implica una intervenció quirúrgica més complexa i altament

invasiva pels pacients pediàtrics presenta una difusió molt més limitada del vector viral a tot el SNC i està associada a certa inflamació local del teixit a la zona d'injecció (Wang, 2019; Bey, 2020).

Uns dels principals vectors AAV utilitzats per al tractament de malalties que afecten el SNC són els vectors AAV9 i AAVrh10 (Verdera, 2020). L'AAV9 és un serotip molt ben estudiat, tant pel que fa a l'eficàcia terapèutica com pel perfil de seguretat, fet pel qual és el vector més utilitzat als estudis clínics (Perez, 2020; Powell, 2020). En alguns estudis preclínics amb ratolins i primats no humans, s'ha observat una transducció més elevada del SNC amb l'AAV9 en comparació amb l'AAVrh10, quan s'injecta intra-LCR (Hordeaux, 2017; Bey, 2020). Recentment, durant el desenvolupament d'aquesta tesi doctoral, s'ha publicat la primera aproximació de teràpia gènica basada en l'administració del vector AAVrh10 en un model hipomorf de ratolí de la NPC2 (Markmann, 2018). L'administració intracisterna de  $1 \times 10^{11}$  vg es va realitzar a les 6 setmanes, quan era pre-sintomàtic, i resulta en una millora de l'acumulació del colesterol, de la inflamació i dels problemes locomotors. Així doncs, aquest estudi demostra la capacitat dels vectors AAV per a prevenir o atenuar la patologia, però cal desenvolupar noves estratègies terapèutiques que permetin tractar els fenotips més severos de la malaltia de NPC2.

En anteriors aproximacions de teràpia gènica realitzades al nostre grup per al tractament d'altres LSD, l'aproximació de teràpia gènica basada en l'administració del vector AAV9 directament al LCR va conduir a una recuperació tant de la patologia del SNC com la dels teixits perifèrics (Haurigot, 2013; Ribera, 2015; Motas, 2016; Roca, 2017). Comparativament, el ratolí model de la NPC2 va presentar una patologia als teixits perifèrics més exacerbada que els altres models de LSD tractats prèviament, fet pel qual es va decidir avaluar la necessitat de la co-administració del vector per via intravenosa. Tenint en compte la severitat del model, es va avaluar si la finestra terapèutica d'entre els 15 i els 30 dies d'edat per tractar als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> era adequada per contrarestar la patologia de la malaltia de NPC2.

Aleshores, l'administració del vector AAV9 als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> va resultar en una expressió elevada del transgèn i la proteïna terapèutica tant a l'encèfal com al fetge. Ara bé, en el cas del fetge, els resultats d'expressió obtinguts evidencien que es produeix una pèrdua de part del vector viral, que es manté principalment de forma episomal a la cèl·lula transduïda, molt probablement a causa de l'alta replicació cel·lular del fetge durant el desenvolupament del ratolí (Cunningham, 2019). Al nostre model de ratolí de la NPC2, el pes del fetge va augmentar 3 vegades entre els 15 i els 60 dies d'edat,



mentre que entre els 30 i els 60 dies només va ser d'1.5 vegades. Així doncs, aquest major creixement del fetge als ratolins injectats a 18 dies d'edat pot explicar la menor expressió hepàtica de la proteïna NPC2 detectada als 60 dies d'edat, en comparació als administrats a 30 dies d'edat. En tot cas, els nivells d'expressió de la proteïna NPC2 aconseguits al fetge van ser suprafisiològics, tant si l'administració es va realitzar als 18 com als 30 dies d'edat. Com que el fetge dels ratolins adults (a partir dels 60 dies d'edat) és majoritàriament quiescent (*Klochender, 2012; Cunningham, 2019*), s'esperaria que la síntesi de la proteïna NPC2 al fetge es mantingués estable i elevada als ratolins adults, amb uns nivells similars als detectats 42 dies post-injecció. A més a més, el fetge té una elevada capacitat secretora, que permet la distribució de les proteïnes lisosòmiques a través del torrent sanguini i la correcció de la resta de teixits perifèrics gràcies al fenomen de la correcció creuada (*Ruzo, 2012; Motas, 2016*). Així doncs, la correcció d'altres teixits perifèrics depèn de la seva capacitat per a captar la proteïna de la circulació venosa, ja que l'AAV9 presenta un tropisme baix per alguns teixits perifèrics, com el pulmó o el ronyó (*Zincarelli, 2008; Yang, 2019*). Aquest fet podria explicar perquè alguns d'aquests teixits perifèrics són més refractaris al tractament, com per exemple, el pulmó.

L'expressió de la proteïna NPC2 com a conseqüència de l'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a un clar increment de l'esperança de vida als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup>. Mentre que l'administració del vector als 30 dies d'edat va suposar un increment de l'esperança de vida d'entre 2 i 3 vegades, l'eficàcia terapèutica més elevada es va assolir quan els ratolins es van tractar als 18 dies d'edat, que encara mantenen una supervivència similar a la dels ratolins WT. Així doncs, l'edat d'administració és clau per tal d'aconseguir un gran benefici terapèutic en aquest aspecte. Comparativament, l'efecte en la supervivència de l'aproximació de teràpia gènica desenvolupada en aquesta tesi doctoral és molt superior a l'obtinguda al model hipomorf tractat amb el vector AAVrh10-*Npc2*, que presenta una supervivència del 70% als 170 dies d'edat comparat amb la nostra del 96-100% amb l'AAV9-*Npc2* i segueixen vius als 275 dies d'edat (*Markmann, 2018*). Cal remarcar que el model de NPC2 desenvolupat en aquesta tesi presenta un fenotip més sever, d'aparició més primerenca i d'evolució més ràpida, i es va tractar quan la patologia ja estava ben desenvolupada. En canvi, l'aproximació de teràpia gènica basada en l'AAVrh10 es va realitzar al model hipomorf amb un fenotip més suau a les 6 setmanes d'edat, quan encara era pre-simptomàtic (*Markmann, 2018*). Per tant, la millora de supervivència aconseguida amb la nostra aproximació de teràpia gènica és clarament superior en unes condicions d'estudi més adverses.

L'acumulació del colesterol al compartiment endo-lisosòmic és un dels desencadenants de tota la fisiopatologia de la malaltia de NPC2. Així doncs, la correcció

de la deficiència de la proteïna NPC2 és imprescindible per tal de revertir l'acumulació del colesterol no esterificat als lisosomes i, conseqüentment, les diverses alteracions patològiques de la malaltia de NPC2. Al SNC, l'alteració del transport del colesterol únicament provoca una acumulació del colesterol als somes neuronals i una disminució als axons, de tal manera que la quantitat total de colesterol no està alterada ni als pacients humans (Vanier, 2010) ni als models murins de NPC1 i NPC2 (Sleat, 2004; Walkley, 2004; Chandler, 2017). L'administració del vector AAV9-*Npc2* als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> va conduir a una reducció de l'acumulació intra-lisosòmica de colesterol al SNC. La reducció va ser molt més gran als animals administrats als 18 dies d'edat, on es van detectar molt poques cèl·lules amb acumulació de colesterol segurament com a conseqüència del major temps d'expressió de la proteïna NPC2 (42 dies post-injecció), en comparació als ratolins tractats a 30 dies d'edat. No es van observar diferències a causa de la dosi administrada, fet que recolza la idea que l'acumulació del colesterol és un paràmetre que requereix cert temps per a revertir-se (Dai, 2017). L'acumulació intra-lisosòmica del colesterol va conduir a la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica al SNC del ratolí model de la NPC2. Conseqüentment, el tractament amb l'AAV9-*Npc2* també va resultar en una millora de la patologia lisosòmica en forma d'una disminució de la distensió lisosòmica i de la desregulació enzimàtica dels enzims  $\beta$ -HEXO i HGSNAT.

El colesterol és un lípid molt important al SNC, on hi actua com a precursor d'algunes hormones esteroides, regula vies de senyalització com a component de la membrana plasmàtica i com a component de les beines de mielina (Saher, 2015). A part de ser un component de la mielina *per se*, el colesterol també és necessari per al transport i la incorporació d'algunes proteïnes estructurals de la mielina, com la PLP1. Així doncs, arran del bloqueig del transport del colesterol, el ratolí model de la NPC2 va presentar una disminució de l'expressió de diversos marcadors del procés de mielinització (*Mag*, *Plp1* i *Ugt8*) detectat molt marcadament als 15 dies d'edat i que es va agreujant progressivament amb l'edat. L'administració del vector AAV9-*Npc2* als ratolins afectats per la malaltia va conduir a la millora de l'expressió d'aquests gens, amb un clar efecte-dosi resposta. Als ratolins, la mielinització del SNC s'inicia a partir del naixement, presenta un pic entre els 10 i els 20 dies de vida i posteriorment disminueix (Takikita, 2004; Saher, 2015). D'acord amb això, les alteracions de la mielinització es van contrarestar eficaçment als animals tractats a 18 dies d'edat.

Per altra banda, cal destacar que les proteïnes de la mielina s'expressen principalment als oligodendròcits madurs. Per tant, aquests resultats poden indicar no només una reducció de la síntesi de mielina, sinó també un defecte en la maduració dels oligodendròcits. De fet, un estudi amb un model murí de la NPC1 ha evidenciat que

l'expressió de la NPC1 tant a les neurones com als oligodendròcits és indispensable per a la correcta maduració dels oligodendròcits (Yu, 2013). Així doncs, com més aviat es tractin els ratolins model de la NPC2, millors podrien ser els beneficis terapèutics per tal d'aconseguir la normalització de l'alteració de la mielinització.

Una de les característiques més peculiars de la NPC2 és la mort de les cèl·lules de Purkinje. Tot i que la neurodegeneració és habitual a les LSD amb afectació del SNC, es desconeix el mecanisme pel qual les cèl·lules de Purkinje presenten una major sensibilitat a la deficiència de la NPC2 en comparació a la resta de neurones. Al nostre model murí de la NPC2, la densitat de les cèl·lules de Purkinje presenta un determinat patró de mort cel·lular on el lòbul anterior del cerebel presenta una reducció més marcada en comparació amb el lòbul posterior. Aquest patró de mortalitat de les cèl·lules de Purkinje també s'ha descrit en altres models de ratolí de la NPC1 (Higashi, 1993; Ko, 2005; Yu, 2011; Marschalek, 2014), al model felí de la NPC1 (Gurda, 2018) i al model hipomorf de la NPC2 (Sleat, 2004), però no sembla ser una característica de la malaltia humana, on la mort és més generalitzada a tot el cerebel. Ara bé, la comparació de la densitat de les cèl·lules de Purkinje als dos models de la NPC2 evidencia que el model hipomorf manté una densitat cel·lular pràcticament indistingible dels animals WT als 49 dies d'edat (Sleat, 2004; Markmann, 2018), mentre que el nostre model només s'observa fins als 30 dies d'edat, moment a partir del qual van disminuint progressivament fins als 60 dies d'edat. Aquesta diferència en la densitat de les cèl·lules de Purkinje evidencia que el nostre model presenta una patologia més severa i accelerada.

L'estudi de la densitat de les cèl·lules de Purkinje analitzat mitjançant la immunohistoquímica contra el marcador Calbindina D28k només dona informació sobre la quantitat de les cèl·lules de Purkinje i no del seu estat funcional. Per tant, és possible que als 15 i 30 dies d'edat, quan els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> encara conservaven una densitat indistingible a la dels ratolins WT, les cèl·lules de Purkinje ja estiguessin alterades funcionalment. De fet, un dels processos patològics que s'han vinculat a la mort de les cèl·lules de Purkinje és l'autofàgia (Ko, 2005; Gurda, 2018). En condicions normals, l'autofàgia és un procés necessari per al reciclatge de macromolècules i d'òrgans envellits, que també s'utilitza com a font de metabòlits quan aquests són escassos. En moltes LSD, l'autofàgia es troba bloquejada com a conseqüència de la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica (Seranova, 2017). Un estudi amb un dels models murins de la NPC1 demostra que el bloqueig del flux autofàgic al cerebel coincideix amb la degeneració i la inducció de l'apoptosi de les cèl·lules de Purkinje (Ko, 2005). Els nostres resultats indiquen que les cèl·lules de Purkinje dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> als 30 dies d'edat ja presentaven una pèrdua de l'homeòstasi severa, ja que tot i presentar una densitat

aparentment normal, presentaven una acumulació de colesterol, una evident distensió lisosòmica, una alteració de l'activitat d'altres enzims lisosòmics i un bloqueig del flux autofàgic. A més a més, l'anàlisi ultraestructural de les cèl·lules de Purkinje realitzat als 60 dies d'edat evidencia que les cèl·lules de Purkinje dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar una morfologia alterada i un gran nombre de vacúols autofàgics al citosol, que corroborava la distensió lisosòmica i el bloqueig del flux autofàgic. Així doncs, la finestra terapèutica per revertir la mort de les cèl·lules de Purkinje és molt limitada, ja que aquestes cèl·lules ja presenten alteracions patològiques a les edats de tractament.

L'administració del vector AAV9-*Npc2* als ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> va conduir a una disminució de la mort de les cèl·lules de Purkinje, amb un efecte molt vinculat a l'edat de tractament. La millora de la densitat de les cèl·lules de Purkinje dels animals tractats a 18 dies d'edat va ser molt superior a la dels ratolins tractats als 30 dies d'edat. Així doncs, és possible que l'expressió de la NPC2 no succeeixi en quantitat suficient i a temps per a poder revertir les alteracions patològiques de les cèl·lules de Purkinje, tot i que l'AAV9 és un dels serotips amb la capacitat d'expressió més ràpida del transgèn (*Zincarelli, 2008*). De fet, la densitat de les cèl·lules de Purkinje als ratolins tractats a 30 dies era similar als animals *Npc2*<sup>-/-</sup> no tractats de 45 dies d'edat. Aquest resultat suggereix que només es van preservar les cèl·lules de Purkinje que a 30 dies d'edat encara no havien arribat al punt de no-retorn. Per altra banda, tot i que amb el tractament als 18 dies d'edat no es va assolir una correcció del 100% de la densitat, diversos estudis en models d'atàxia cerebel·losa senyalen que una densitat del 100% no és necessària per al funcionament correcte del cerebel (*Sarna, 2003*). Específicament a la NPC, un estudi amb ratolins *WT* i *Npc1*<sup>-/-</sup> va demostrar que un 30-60% de les cèl·lules de Purkinje sanes era suficient per a prevenir l'atàxia (*Lopez, 2011*). Per tant, els nivells de correcció assolits amb l'administració d'AAV9-*Npc2* als 18 dies podrien ser suficients per revertir l'atàxia provocada per la mort de les Purkinje.

La neuroinflamació és un procés molt habitual a les LSD amb afectació neurològica. Consisteix en l'activació de la micròglia, els macròfags residents al SNC, i els astròcits, un tipus de glia amb funcions de suport a les neurones, com a conseqüència de la pertorbació de l'homeòstasi al cervell (*Jang, 2013; Palpagama, 2019*). El model de la NPC2 va presentar una neuroinflamació generalitzada a tot l'encèfal, com a resultat de les alteracions patològiques al SNC. L'administració del vector AAV9-*Npc2* va conduir a una reducció molt marcada de l'astrocitosi i la microgliosi. De forma similar a la resta de paràmetres, es va observar una major eficàcia terapèutica quan el tractament es va realitzar als ratolins més joves, als 18 dies d'edat, amb un efecte dosi-resposta moderat. A diferència de la majoria de zones de l'encèfal

analitzades, la reducció de la neuroinflamació al cerebel va ser parcial. Diversos estudis en models de ratolí de la NPC1 indiquen que l'activació dels astròcits és secundària a la pèrdua de l'homeòstasi neuronal i que, per tant, no contribueix activament al desenvolupament de la patologia (Lopez, 2011, 2013; Yu, 2011). Per tant, simplement és possible que es necessiti un major temps d'expressió del tractament per a resoldre de forma completa la patologia de les cèl·lules de Purkinje i, en conseqüència, la neuroinflamació al cerebel.

A part de les alteracions al SNC, la deleció del gen *Npc2* també va conduir a l'acumulació de colesterol, a la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica i a l'activació dels macròfags en diversos teixits perifèrics. Els òrgans que van acumular més quantitat de colesterol eren el fetge i la melsa, fet que també s'ha observat als pacients humans i als models murins de la NPC1 i NPC2 (Sleat, 2004; Griese, 2010; Roszell, 2013; Neßlauer, 2019). L'administració del vector AAV9-*Npc2* va resultar en una producció suprafisiològica de la NPC2 a qualsevol de les dosis administrades. En conseqüència, es va observar una normalització de les alteracions patològiques al fetge. A més a més, altres òrgans amb un tropisme baix per l'AAV9, com el ronyó o la melsa (Yang, 2019), també es van corregir totalment gràcies a la correcció creuada. En canvi, només es va observar una correcció parcial de l'acumulació de colesterol, la distensió lisosòmica i la inflamació a un dels òrgans més afectats a la NPC2, el pulmó. Es tracta d'un òrgan força refractari al tractament amb AAV i, en comparació a la resta de teixits perifèrics, té una capacitat inferior per captar les proteïnes lisosòmiques del sèrum (Motas, 2016; Beshlawy, 2019). Això, sumat a la major afectació d'aquest òrgan, pot indicar que es necessita més temps post-injecció per tal de revertir la patologia pulmonar. El fet que els ratolins administrats a 18 dies tinguin una eficàcia terapèutica al pulmó major que la dels injectats a 30 dies d'edat, també recolza aquesta hipòtesi. En conjunt, aquests resultats indiquen que l'administració intracisterna del vector AAV9 és suficient per a assolir una correcció tant del SNC com dels teixits perifèrics i, per tant, la co-administració del vector per via intravenosa en els estudis pre-clínic no ha demostrat un benefici terapèutic superior per justificar-ne el seu ús en un futur assaig clínic en humans.

Les millores funcionals tenen una elevada rellevància clínica, ja que són les que tenen més impacte en la qualitat de vida dels pacients. Així doncs, tot i que la millora de les alteracions bioquímiques i histològiques és important, l'objectiu de qualsevol teràpia hauria de ser, en última instància, la recuperació dels dèficits funcionals per tal d'augmentar l'estat del benestar dels pacients. A part de millorar els diversos paràmetres

bioquímics de la patologia, l'administració del vector *AAV9-Npc2* també va permetre la correcció funcional dels dèficits locomotors i del pes corporal del model murí de la NPC2.

L'atàxia cerebel·losa és un dels símptomes neurològics més freqüents i d'aparició més primerenca a la malaltia de NPC i afecta a gairebé un 70% dels pacients (*Iturriaga, 2006; Patterson, 2020*). Aquest símptoma és una conseqüència de la mort progressiva de les cèl·lules de Purkinje al cerebel (*Lloyd-Evans, 2010*). Al ratolí model de la NPC2, les primeres alteracions locomotores a la prova de l'actímetre van aparèixer als 30 dies d'edat, però no va ser fins als 60 dies quan es van observar uns dèficits locomotors molt més evidents, com recórrer menys distància, estar menys temps en moviment i realitzar-ho a menys velocitat. De manera similar, els ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> van presentar alteracions de la coordinació als 60 dies d'edat, detectat a la prova del *rotarod* i el *Mesh test*. A més a més, aquesta última prova, el *Mesh test*, també mesura de forma indirecta la força dels ratolins i, per tant, podria indicar la presència d'hipotonia al model de ratolí de la NPC2, una característica també present als pacients humans (*Iturriaga, 2006; Sévin, 2007; Davidson, 2010*). Així doncs, l'aparició de les alteracions del comportament locomotor i la coordinació van presentar una correlació directa amb la pèrdua de la densitat de les cèl·lules de Purkinje al cerebel. Conseqüentment, l'increment de les cèl·lules de Purkinje a causa de l'administració del vector *AAV9-Npc2* va conduir a una millora de l'activitat locomotora i la coordinació dels ratolins tractats, que era major als animals tractats als 18 dies en comparació als administrats a 30 dies d'edat. Aquests resultats també donen suport a la idea de tractar els pacients humans el més aviat possible per tal d'aconseguir preservar una densitat de les cèl·lules de Purkinje elevada i una millora funcional més gran.

A part de participar en el control de la coordinació i la marxa, el cerebel també participa en el de la deglució (*Rangarathnam, 2014*). De fet, la disfàgia és un altre símptoma neurològic molt freqüent als pacients humans (*Vanier, 2010; Patterson, 2020*). És possible, doncs, que les alteracions patològiques a les cèl·lules de Purkinje combinat amb les alteracions funcionals provocades pel cerebel dels ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> dificultessin l'accés i la ingestió del menjar i, conseqüentment, contribuïssin a la disminució del pes corporal. De fet, els resultats obtinguts indiquen que els problemes de creixement van començar a ser evidents a partir dels 30 dies d'edat, moment a partir del qual es va començar a observar la pèrdua de les cèl·lules de Purkinje. Per tant, la millora del pes corporal produïda per l'administració del vector *AAV9-Npc2* es podria considerar, en part, una evidència de la recuperació funcional del cerebel.

Un dels principals obstacles a superar en el desenvolupament de la nostra aproximació de teràpia gènica va ser l'estreta finestra terapèutica a causa de la severitat del model de la malaltia. A les LSD, hi ha una acumulació de diversos substrats no degradats als lisosomes de totes les cèl·lules de l'organisme que condueix a la pèrdua de l'homeòstasi lisosòmica. Aquestes alteracions patològiques són, fins a cert punt, reversibles quan es recupera l'expressió de la proteïna deficient, en el nostre cas, la NPC2. Ara bé, si l'alteració funcional del lisosoma no es resol a temps en determinats tipus cel·lulars, la pèrdua de l'homeòstasi cel·lular esdevé irreversible i condueix a la mort de la cèl·lula. En un teixit amb alta capacitat regenerativa com el fetge, això no suposa un problema greu (*Hori, 2012*). Contràriament, el SNC és un teixit amb molt poca capacitat regenerativa, on hi intervenen molts tipus cel·lulars diferents amb vies i funcions molt especialitzades, fet pel qual pot suposar un gran impacte negatiu rebre el tractament fora de la finestra terapèutica adequada.

Per exemple, les cèl·lules de Purkinje són la única via eferent del còrtex cerebel·lós (*Sarna, 2003*) i les lesions al cerebel estan associades a l'aparició de problemes motors, com l'atàxia, la disfàgia o la disàrtria, uns dels símptomes més característics de la malaltia de NPC2 (*Davidson, 2010; Rangarathnam, 2014; Evans, 2017*). Com que les cèl·lules de Purkinje són un dels tipus cel·lulars més vulnerables a la deficiència de la NPC2 (*Vanier, 2010*), els ratolins que van mantenir una densitat de les cèl·lules de Purkinje elevada, els tractats als 18 dies d'edat, van presentar una millora funcional pel que fa a la coordinació i al pes corporal, així com també de la supervivència. Aquests resultats indiquen que: (i) les cèl·lules de Purkinje són de vital importància com a diana terapèutica per al tractament de la NPC2 i (ii) la teràpia s'ha d'administrar el més aviat possible per recuperar aquest tipus cel·lular abans que les lesions lisosòmiques i cel·lulars siguin irreversibles. Aquesta observació concorda amb la història natural de la malaltia humana, on s'observa que l'edat d'inici dels símptomes neurològics, molts d'ells vinculats a la funció del cerebel, marca la progressió i la severitat de la malaltia (*Vanier, 2010; Geberhiwot, 2018*).

En conclusió, aquests resultats confirmen l'eficàcia terapèutica d'una única administració dels vectors AAV9-*Npc2* directament al LCR per al tractament de la malaltia de NPC2. L'aproximació de teràpia gènica es va estudiar en un nou ratolí model de la malaltia que presentava un fenotip molt més sever i amb una progressió més agressiva que el model hipomorf de la NPC2. A més a més, l'administració del vector AAV9-*Npc2* es va realitzar quan el fenotip ja estava establert i va ser capaç de corregir les alteracions patològiques al SNC i als teixits perifèrics, així com conduir a una millora del comportament i un increment de la supervivència. Per tant, es podria considerar que

els resultats obtinguts al model murí són una prova de l'eficàcia terapèutica en unes condicions molt desfavorables i, per tant, amb el potencial per a curar tota la diversitat fenotípica de la malaltia humana, des dels pacients pediàtrics als adults. Així doncs, aquest estudi suposa una base sòlida per a la translacionalitat clínica d'aquesta aproximació de teràpia gènica per al tractament dels pacients de la malaltia de NPC2.





## ***VI. Conclusions***



1. Es va generar un ratolí *knock out* model de la malaltia de NPC2 deficient en la proteïna NPC2, que va presentar un fenotip molt sever amb una marcada reducció de l'esperança de vida.
2. El ratolí model de la NPC2 va desenvolupar els principals signes clínics de la malaltia com a conseqüència de l'acumulació de colesterol no esterificat al SNC i als teixits perifèrics, així com problemes locomotors i una reducció del pes corporal. La patologia ja estava ben establerta als 15 dies d'edat.
3. L'administració directament al LCR del vector AAV9 codificant per la proteïna NPC2 va donar lloc a una transducció eficient del SNC i el fetge, amb una elevada expressió de la NPC2 en ambdós teixits.
4. El tractament amb el vector AAV9-*Npc2* a ratolins *Npc2*<sup>-/-</sup> va conduir a una millora de l'acumulació de colesterol no esterificat i de la patologia lisosòmica, així com a una millora del procés de la mielinització i de la neuroinflamació.
5. L'administració del vector AAV9-*Npc2* a una edat més primerenca, als 18 dies d'edat, és imprescindible per a preservar una elevada densitat de les cèl·lules de Purkinje.
6. L'administració intra-LCR del vector AAV9-*Npc2* va ser suficient per a generar una expressió suprafisiològica de la NPC2 al fetge, sense la necessitat de la co-administració del vector per via intravenosa, que va conduir a la normalització de l'acumulació del colesterol, de la distensió lisosòmica i de la inflamació al fetge.
7. Gràcies a la correcció creuada, l'expressió hepàtica de la NPC2 va conduir a la secreció de la proteïna NPC2 al torrent sanguini, fet que va permetre la millora o correcció de les alteracions patològiques a la resta de teixits perifèrics.
8. El tractament amb el vector AAV9-*Npc2* a l'edat de 18 dies va presentar la millor eficàcia terapèutica, que va conduir a un augment del pes corporal, dels problemes locomotors i de la coordinació, així com a un increment significatiu de l'esperança de vida.
9. En resum, aquests resultats permeten establir les bases cap a la translació clínica de l'aproximació de teràpia gènica basada en l'administració al LCR del

vector AAV9-*Npc2* per al tractament de la patologia neurològica i somàtica de la malaltia de Niemann-Pick tipus C2.

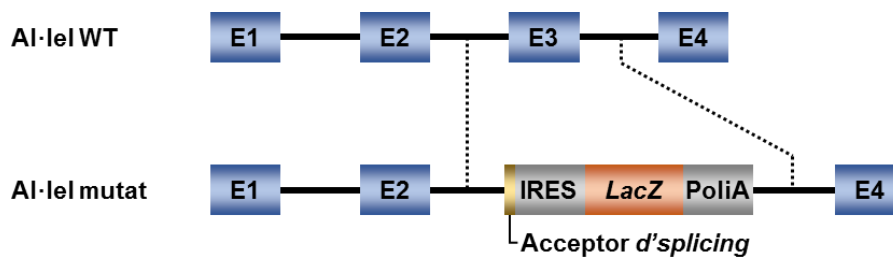
## ***VII. Materials i mètodes***



## 1. MATERIALS

### 1.1. Animals

Es va adquirir esperma de ratolins heterozigots per a una mutació del gen *Npc2* al consorci internacional IMPC (*International Mouse Phenotyping Consortium*). La soca del ratolí era C57BL/6NCrl-*Npc2*<sup>tm1e.1(EUCOMM)Wtsi</sup>. La mutació del gen *Npc2* consisteix en la substitució d'un fragment del gen que conté l'exó 3 per la casset d'expressió de la proteïna LacZ, que inclou un acceptor d'*splicing*, un lloc intern d'entrada al ribosoma (IRES, *internal ribosome entry site*) i una seqüència PoliA (Figura 66).



**Figura 66. Esquema representatiu de l'al·lel WT i mutat del gen *Npc2* murí.** L'al·lel WT del gen *Npc2* murí conté 4 exons, mentre que a l'al·lel mutat (*Npc2*<sup>tm1e.1(EUCOMM)Wtsi</sup>) s'hi ha substituït l'exó 3 per la casset d'expressió de la proteïna LacZ. Les caixes blaves corresponen als exons del gen *Npc2*; la groga, a l'acceptor d'*splicing*; les grises, a la seqüència IRES i la PoliA; i la taronja, a la seqüència codificant de la LacZ. Les línies negres contínues indiquen els introns i les discontinues, la regió diferent entre ambdós al·lels. L'esquema no està a escala.

Els primers animals heterozigots es van generar mitjançant la fecundació *in vitro* de femelles WT de la soca C57BL/6NHsd amb l'esperma adquirit de l'IMPC. La colònia es va establir i mantenir a partir del creuament de ratolins heterozigots per a la mutació.

Els ratolins es van mantenir a les instal·lacions lliure de patògens específics (SPF, *specific-pathogen-free*) del Servei d'Establiment de Ratolins del CBATEG en condicions controlades d'il·luminació (cicle de llum i fosc de 12 hores, amb obertura de llums a les 8h del matí) i de temperatura (22°C ± 2°C), i alimentats *ad libitum* amb una dieta estàndard (Teklad Global 18% protein rodent diet, 2018S; Envigo)

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



## 1.2. Soques bacterianes

Per a generar tots els constructes de la present tesi doctoral, es van utilitzar les soques d'*E. coli* XL2-Blue (Agilent Technologies), Stbl3 i Dh5 $\alpha$  (Thermo Fisher Scientific). Tots els plasmidis contenien un gen de resistència a la kanamicina o a l'ampicil·lina per la seva selecció en els cultius bacterians, motiu pel qual aquests cultius es van fer créixer en medi LB (Conda) amb 30  $\mu$ g/ml de kanamicina o 50  $\mu$ g/ml d'ampicil·lina. Quan les condicions experimentals feien necessari el creixement dels cultius en medi sòlid, s'hi va afegir un 2% d'agar.

## 1.3. Anticossos

Els anticossos enumerats a la Taula 5 i la Taula 6 es van utilitzar per a realitzar les immunohistoquímiques i els *Western blots*, respectivament.

Taula 5. Llista d'anticossos utilitzats a les immunohistoquímiques.

Immunohistoquímica				
Anticòs	Hoste	Proveïdor	Referència	Dilució
<b><i>Anticossos primaris</i></b>				
Anti-LIMP2	Conill	Novus Biologicals	NB400-129	1/100
Anti-Calbindina D28k	Ratolí	Swant	CB300	1/1000
BSIB4 (Isolectina)	-	Merck	L5391	1/100
Anti-GFAP	Conill	Dako	Z0334	1/1000
Anti-Mac-2	Rata	Cedarlane	CL8942AP	1/50
<b><i>Anticossos secundaris</i></b>				
Anti-Rabbit IgG biotinilated	Cabra	ThermoFisher	31820	1/300
Anti-Mouse IgG biotinilated	Cavall	Vector Labs	BA-2000	1/300
Anti-Rat IgG biotinilated	Conill	Dako	E0467	1/300

Taula 6. Llista d'anticossos utilitzats als *Western blot*.

<b>Western blot</b>				
<b>Anticòs</b>	<b>Hoste</b>	<b>Proveïdor</b>	<b>Referència</b>	<b>Dilució</b>
<b>Anticossos primaris</b>				
Anti-NPC2	Conill	Merck	HPA000835	1/10000
Anti-LC3B	Conill	Novus Biologicals	NB100-2220	1/2000
Anti- $\alpha$ Tubulina	Conill	Abcam	Ab4074	1/2000
<b>Anticossos secundaris</b>				
Anti-Rabbit IgG HRP conjugate	Porc	Dako	P0217	1/20000

#### 1.4. Plasmidis

Els plasmidis utilitzats per la producció dels vectors virals AAV s'indiquen a la Taula 7.

Taula 7. Llista de plasmidis.

<b>Plasmidi</b>	<b>Promotor</b>	<b>Insert</b>	<b>Senyal de poliadenilació</b>
pAAV-CAG	CAG	-	$\beta$ -globina de conill
<i>pomNpc2_v1</i>	-	<i>Npc2</i> de ratolí optimitzada	-
pAAV-CAG- <i>omNpc2</i>	CAG	<i>Npc2</i> de ratolí optimitzada	$\beta$ -globina de conill

El plasmidi pAAV-CAG conté les seqüències ITR necessàries per l'encapsidació dels vectors AAV, el promotor CAG, un polilligador i la seqüència PoliA de la  $\beta$ -globina de conill. El CAG és un promotor híbrid format pel potenciador de la transcripció del citomegalovirus humà (CMV), el promotor de la  $\beta$ -actina de pollastre i el primer intró del gen de la  $\beta$ -globina humana, que en conjunt permet una expressió robusta i ubiqua. El plasmidi *pomNpc2\_v1* conté la seqüència de la *Npc2* murina optimitzada. Per tal d'incrementar la transcripció i estabilitat del mRNA i la traducció proteica, la seqüència de la *Npc2* murina es va optimitzar mitjançant un algorisme comercial que té en compte diversos paràmetres, com ara l'ús de codó, el contingut en CG, possibles estructures secundàries, entre d'altres. Per a generar el plasmidi pAAV-CAG-*omNpc2* per produir els vectors virals AAV, es va clonar la seqüència *omNpc2* del plasmidi *pomNpc2\_v1* al polilligador del plasmidi pAAV-CAG amb els enzims de restricció MluI i EcoRI.

### 1.5. Reactius

Tots els reactius de biologia molecular utilitzats en el desenvolupament d'aquesta tesi s'han obtingut dels següents fabricants: Abcam (Cambridge, Regne Unit), DakoCytomation (Glostrup, Dinamarca), Life Technologies (Carlsbad, CA, EUA), Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA), Panreac (Barcelona, Espanya), Promega Corporation (Madison, WI, EUA), Qiagen (Hilden, Alemanya), Swant (Marly, Suïssa), New England Biolabs (Ipswich, MA, EUA), Roche (Basilea, Suïssa), Fermentas (St. Leon-Rot, Alemanya), Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), Stratagene-Agilent Technologies, (Santa Clara, CA, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanya), Invitrogen (Carlsbad, CA, EUA), Lucigen (Middleton, WI, EUA), Bio-Rad Laboratories (Hercules, CA, EUA), Vector Laboratories Ltd. (Burlingame, CA, EUA), Laboratoris del Dr. Esteve (Barcelona, Espanya), Electron Microscopy Science (Hatfield, PA, EUA), Millipore (Burlington, MA, EUA), Epicentre Biotechnologies Ecogen (Barcelona, Espanya), Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, EUA), Cedarlane (Burlington, ON, Canadà), Novus Biologicals (Littleton, CO, EUA), iNtRON Biotechnology (Sangdaewon, Corea del Sud), Greiner Bio-One (Kremsmünster, Àustria), Hamilton Company (Reno, NV, EUA), B. Braun (Melsungen, Alemanya), Harvard Apparatus (Cambridge, MA, EUA), Philips (Amsterdam, Països Baixos), Carbosynth (Thal, Suïssa), Horiba (Kyoto, Japó)

## 2. MÈTODES

### 2.1. Genotipatge dels ratolins NPC2

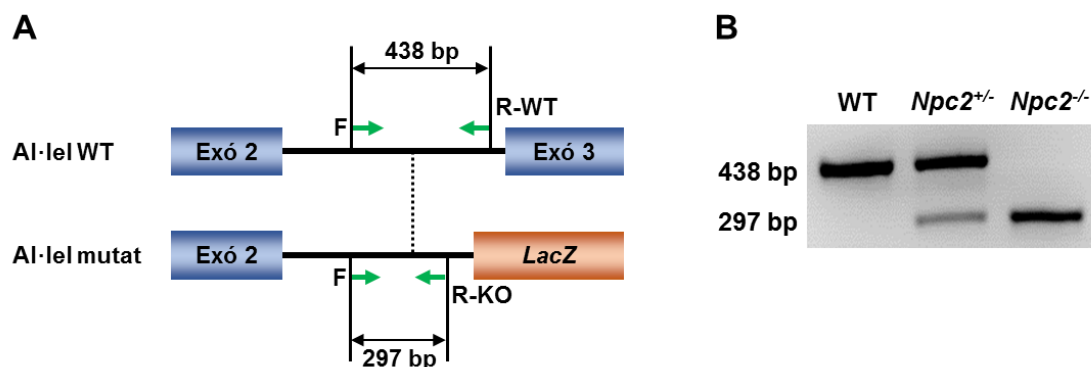
El genotipatge dels ratolins NPC2 es va realitzar amb el DNA genòmic obtingut del tall de la cua, mitjançant la PCR per a detectar la presència de la casseta d'expressió del LacZ.

#### 2.1.1. Aïllament del DNA genòmic

L'obtenció del DNA genòmic es va fer a partir de mostres de cua d'uns 0.5 cm de longitud de ratolins al voltant de les 3 setmanes d'edat. Els fragments de cua es van incubar durant 30 minuts a 95°C en 100 µl de tampó de lisi (25 mM NaOH, 0.2 mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 12). Posteriorment, es van atemperar les mostres i es va aturar la reacció de lisi mitjançant l'addició de 100 µl de tampó de neutralització (40 mM Tris-HCL, pH 5).

#### 2.1.2. Genotipatge per PCR

L'estratègia de genotipatge estava dissenyada per discriminar entre l'al·lel WT i l'al·lel mutat. Aquesta estratègia consistia en la utilització d'un oligonucleòtid que reconeixia una zona comuna entre ambdós al·lells (*Forward*), simultàniament amb dos altres oligonucleòtids que reconeixen una zona específica de cada al·lel (*Reverse WT* i *Reverse KO*), tal com es mostra a la (Figura 67A).



**Figura 67. Genotipatge de la colònia dels ratolins NPC2.** (A) Esquema dels llocs d'unió dels oligonucleòtids (fletxes verdes) que es van utilitzar a la PCR. L'oligonucleòtid *forward* (F) hibridava a la zona comuna dels dos al·lells i els oligonucleòtids *reverse WT* (R-WT) i KO (R-KO) hibridaven a l'exó 3 i a la casseta d'expressió del *LacZ* a l'al·lel WT i mutat, respectivament. La línia discontinua delimita la zona homòloga entre els dos al·lells. El producte de la PCR a l'al·lel WT era de 438 bp i a l'al·lel mutat de 297 bp. (B) Imatge representativa d'un gel d'agarosa del genotipatge d'un ratolí WT (438 bp), *Npc2*<sup>+/-</sup> (297 i 438 bp) i *Npc2*<sup>-/-</sup> (297 bp).

Les seqüències dels oligonucleòtids utilitzats són les següents: *Forward*: 5'-CTC TTC CGG GTC ACT GAC AA-3'; *Reverse WT*: 5'-CAA GGG AAT CAG GCT ACT GG G-3'; *Reverse KO*: 5'- TAG GAA CTT CGG TTC CGG C-3'. La PCR es va realitzar utilitzant el *kit* comercial *GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase* (Promega Corporation) amb les condicions detallades a la Taula 8.

**Taula 8. Components de la reacció de PCR de genotipació.**

Reactiu	Volum per 1 reacció (µl)
5X <i>GoTaq Flexi Green Buffer</i>	3
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	1.5
dNTP (25 mM)	0.3
Oligonucleòtid <i>Forward</i> (10 µM)	0.3
Oligonucleòtid <i>Reverse WT</i> (10 µM)	0.3
Oligonucleòtid <i>Reverse KO</i> (10 µM)	0.6
<i>GoTaq G2 Flexi DNA Polymerase</i> (5U/µl)	0.1
DNA genòmic	1
Aigua Mili-Q	8
<b>Volum final</b>	<b>15</b>

La reacció consistia en una desnaturalització inicial de 3 min a 95°C seguida de 40 cicles que inclouen una desnaturalització de 30 s a 95°C, una hibridació de 30 s a 63°C i una elongació de 15 s a 72°C, i una fase final d'elongació de 5 min a 72°C.

Un cop realitzada la PCR, les mostres es carregaven en un gel d'agarosa al 1% amb bromur d'etidi o RedSafe. La mida de les bandes esperada era de 438 bp pels ratolins WT, dues bandes de 297 i 438 bp pels ratolins heterozigots (*Npc2*<sup>+/-</sup>) i una banda de 297 per als ratolins homozigots per a la mutació (*Npc2*<sup>-/-</sup>) (Figura 67B).

## 2.2. Tècniques de manipulació del DNA

### 2.2.1. Preparació del DNA plasmídic

Les minipreparacions de DNA plasmídic es van dur a terme mitjançant un protocol basat en la lisi alcalina descrit prèviament (*Birnboim, 1978*). Quan es van necessitar quantitats més grans de DNA, es van utilitzar els kits comercials *PureYieldTM*

*Plasmid MaxiPrep System* (Promega Corporation) i *EndoFree Plasmid Mega/Giga Kit* (Qiagen).

### **2.2.2. Digestió del DNA amb enzims de restricció**

Cadascun dels enzims de restricció utilitzats requerien d'unes condicions de reacció específiques pel que fa a pH, força iònica, temps i temperatura de digestió. Per tant, en cada cas específic es van seguir les instruccions dels proveïdors (New England Biolabs, Roche o Fermentas). En termes generals, el DNA va ser digerit mitjançant 0,5 unitats d'enzim per µg de DNA durant 2 hores amb el tampó específic per cada cas. Els productes de digestió es van analitzar mitjançant els gels d'agarosa a l'1% p/v. Quan es va fer necessària la utilització de dos enzims de restricció, ambdues digestions es van dur a terme simultàniament si els 2 enzims actuaven eficientment amb el mateix tampó i temperatura. Si els enzims tenien requeriments diferents, després de la primera digestió es va purificar el DNA per tal d'eliminar-ne les sals, els enzims i d'altres restes de la reacció, mitjançant el *kit* comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Fermentas), seguint les instruccions del proveïdor. Finalment, el DNA es va eluir en 30 µg d'aigua i posteriorment es va digerir amb el segon enzim de restricció en les condicions específiques que requeria el segon enzim.

### **2.2.3. Desfosforilació dels fragments de DNA**

Com que el DNA plasmídic es pot religar després d'haver estat digerit, es poden eliminar els residus de fosfat dels extrems 5' per tal d'evitar-ho. Per a la desfosforilació, es va utilitzar 1 unitat de fosfatasa alcalina amb el tampó comercial a 1x per cada 1-5 µg de DNA (*FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase*, Fermentas). Després d'incubar les mostres a 37°C durant 10 min, es va procedir a la inactivació de la fosfatasa alcalina a 75°C durant 5 min.

### **2.2.4. Generació d'extrems roms**

Quan el clonatge dels constructes requeria la lligació d'extrems roms, es van tractar els fragments de DNA amb extrems cohesius amb el fragment de Klenow (*DNA Polymerase I, Large (Klenow) Fragment*, Fermentas), seguint el protocol del fabricant. En presència de la doble cadena de DNA i de dNTP, el fragment de Klenow omple

els extrems protuberants 5', mitjançant l'activitat polimerasa 5'→3', i elimina els extrems protuberants 3', a causa de l'activitat exonucleasa 3'→5'.

### **2.2.5. Lligació dels fragments de DNA**

La *T4 DNA ligase* (New England Biolabs) es va utilitzar per a les reaccions de lligació seguint les instruccions de la casa comercial. Les reaccions de lligació es van dur a terme amb el tampó de lligació específic suplementat amb adenosina trifosfat (ATP) durant 30 min a temperatura ambient.

### **2.2.6. Transformació de les cèl·lules competents**

El DNA plasmídic es pot introduir a dins dels bacteris elèctricament competents per un procés de transformació elèctrica o electroporació. Es va barrejar un volum de 40 µl de cèl·lules competents XL2-blue ( $2 \times 10^{10}$  cèl·lules/ml) i 10 ng de DNA en un volum d'1 µl i es van mantenir en gel durant 5 min. Posteriorment, es va dur a terme l'electroporació a 2500 V mitjançant un electroporador (Bio-Rad). A continuació, es va afegir 200 µl de medi LB preescalfat a 37°C a la solució d'electroporació. Finalment, es va realitzar la sembra en placa sobre medi LB amb l'antibiòtic corresponent.

Per altra banda, els bacteris químicament competents (Dh5α i Stbl3) es van transformar per xoc tèrmic. En aquest cas, les cèl·lules competents i el DNA es van mantenir en gel durant 30 min. Posteriorment, es va realitzar el xoc tèrmic a 37°C durant 20 s amb les cèl·lules Dh5α o a 42°C durant 45 s amb les Stbl3. A continuació, es van incubar 60 s en gel i es van sembrar en placa sobre medi LB amb l'antibiòtic corresponent.

### **2.2.7. Purificació i resolució del DNA**

Per a la separació i purificació dels fragments de DNA, es van utilitzar electroforesis en gels d'agarosa a l'1% p/v. La localització i mida relativa dels fragments de DNA es va determinar per la tinció del gel amb baixes concentracions de bromur d'etidi (0.5 µg/ml) o *RedSafe* (1x) (iNtRON Biotechnology). Els diferents fragments de DNA es van visualitzar amb llum ultraviolada de baixa longitud d'ona (310 nm) mitjançant una càmera integrada en un transil·luminador (Syngene). Com a marcadors de pes molecular, es van utilitzar els marcadors comercials *DNA ladder 1 kb* i/o *DNA ladder 100 bp* (Invitrogen).

Prèviament, els gels havien estat preparats mitjançant la dissolució de l'agarosa amb el buffer d'electroforesi 1x TAE (Tris-acetat pH 8.3, 40 mM i EDTA 1 mM) juntament amb la proporció corresponent de bromur d'etidi o *RedSafe*. Les mostres es van carregar al gel amb tampó de càrrega 10x (Invitrogen) i la separació del DNA es va dur a terme en el tampó d'electroforesi 1x TAE al voltant de 90 V.

Quan es feia necessària l'extracció i la purificació d'algun dels fragments de DNA separats, aquesta es realitzava amb el *kit* comercial *GeneJET™ Gel Extraction kit* (Fermentas). Finalment, la quantificació del DNA es va dur a terme en un espectrofotòmetre (*Nanodrop 1000 spectrophotometer*, Thermo Fisher Scientific).

## **2.3. Tècniques d'obtenció i manipulació del RNA**

### **2.3.1. Aïllament i purificació de RNA total**

L'aïllament de RNA total es va dur a terme mitjançant l'homogeneïtzació de mostres congelades en *TriPure Isolation Reagent* (Roche) amb un polítró. L'extracció de RNA es basa en una extracció de fenol-cloroform de teixits homogeneïtzats utilitzant la tiocianat guanidina com a inhibidor de la ribonucleasa. La fracció corresponent al RNA es va extreure mitjançant l'addició de 0.2 ml de cloroform per cada ml de Tripure, i seguidament es van utilitzar les columnes d'adsorció per a la purificació del RNA, *RNeasy Mini Kit* (Qiagen) seguint les instruccions del fabricant. Totes les mostres es van tractar amb DNasa I directament a la columna amb el *kit* comercial *RNase-Free DNase Set* (Qiagen), seguint les instruccions del fabricant. Després de realitzar dos rentats a la columna amb el tampó corresponent, es va eluir el RNA total per mitjà de l'addició de 30-50 µl d'aigua Mili-Q. Finalment, la concentració i la qualitat de les mostres de RNA es va determinar mitjançant la mesura de l'absorbància al rang ultraviolat amb l'espectrofotòmetre *NanoDrop ND-1000* (Termo Fischer Scientific).

### **2.3.2. Síntesi del cDNA**

Es va retrotranscriure 1 µg de RNA total a cDNA utilitzant el *kit* comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis* (Roche), seguint les instruccions del fabricant. Es van utilitzar oligonucleòtids Oligo-dT i hexàmers aleatoris per a l'amplificació del cDNA en presència de *Protector RNase Inhibitor*, present al *kit* comercial (Roche).



### 2.3.3. Quantificació de l'expressió del mRNA per qPCR

Després de la retrotranscripció, el cDNA de les mostres es va diluir 1/10 per tal de dur a terme la qPCR. La qPCR es va realitzar amb els kits *LightCycler® 480 SybrGreen I Master* (Roche), seguint les instruccions del fabricant (Taula 9). Els oligonucleòtids utilitzats s'indiquen a la Taula 10.

Taula 9. Components de la qPCR mitjançant SybrGreen.

Reactiu	Volúms per 1 reacció (µL)
2x LightCycler 480 SybrGreen I Master	5
Primer Forward (10 mM)	0.2
Primer Reverse (10 mM)	0.2
Aigua Mili-Q	2.6
cDNA diluït 1/10	2
<b>Volum total</b>	<b>10</b>

Taula 10. Llista d'oligonucleòtids utilitzats a la qPCR.

Gen	Oligonucleòtid (5'→3')
<i>mmMag</i>	<b>Forward</b> TACAACCAGTACACCTTCTCGG
	<b>Reverse</b> ATACAACCTGACCTCCACTTCCG
<i>mmPlp1</i>	<b>Forward</b> TTCCAGAGGCCAACATCAAG
	<b>Reverse</b> AGGAGCCATACAACAGTCAG
<i>mmUgt8a</i>	<b>Forward</b> AGTTTCCAAGACCAACGCTGC
	<b>Reverse</b> TGTTCTGAGCACCCTTACC
<i>mmNpc2</i>	<b>Forward</b> AAGGACTGCGGCTCTAAGGT
	<b>Reverse</b> TGCTGTTCTGGGACTGAGTG
<i>omNpc2</i>	<b>Forward</b> CCATCCAGAAAGACAAGGTG
	<b>Reverse</b> TCTCCAGCTTCCATTCCAC
<i>mmRplp0</i>	<b>Forward</b> ACTGGTCTAGGACCCGAGAGG
	<b>Reverse</b> TCCCACCTTGTCTCCAGTCT
<i>hsRPLP0</i>	<b>Forward</b> TGGTCATCCAGCAGGTGTTCTGA
	<b>Reverse</b> ACAGACACTGGCAACATTGCGG

*mm*: *Mus musculus*; *om*: *optimitzada murina*; *hs*: *Homo sapiens*.

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

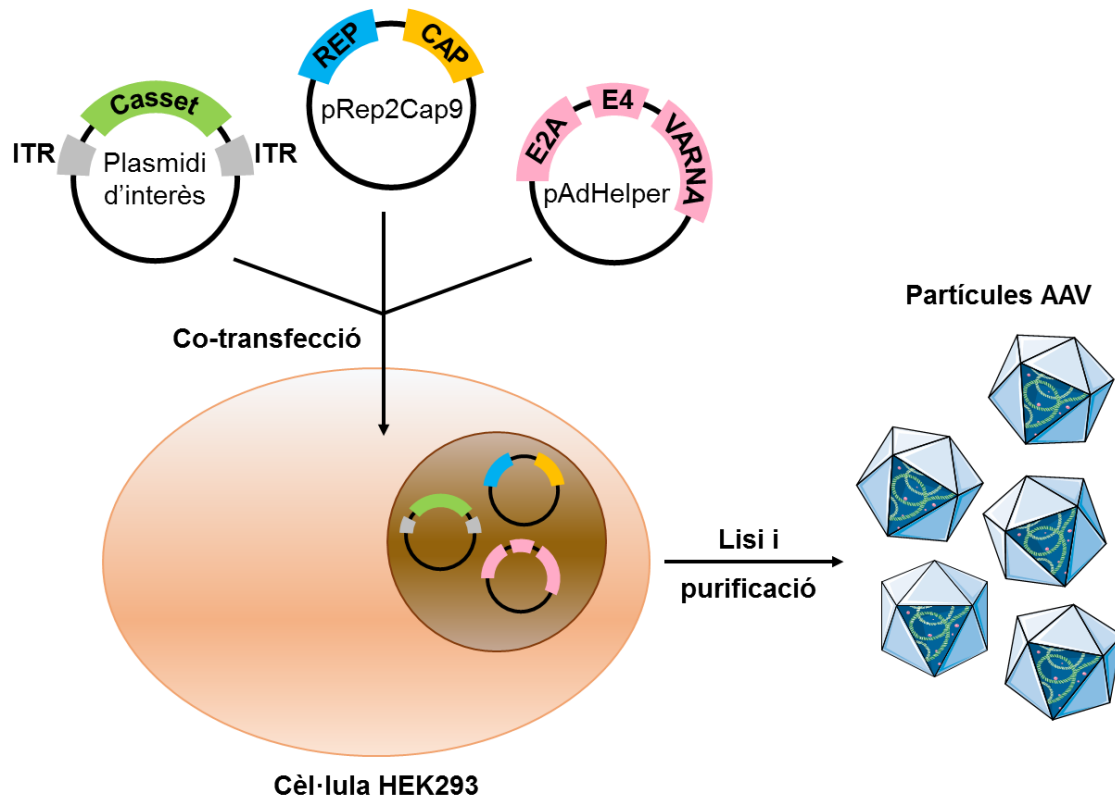
Per a la transfecció *in vitro* de cultius cel·lulars HEK-293 amb DNA plasmídic, es va seguir el protocol comercial *Lipofectamine™ 2000* (Invitrogen), basat en la transfecció del DNA amb liposomes catiónics. Breument, cultius adherents de cèl·lules HEK-293 en plaques de 6 pous (*Thermo Fisher Scientific*) es van transfectar amb 4 µg de DNA plasmídic inclòs a l'interior dels liposomes catiónics formats per la Lipofectamina, seguint les instruccions del fabricant. Passades les 48 hores d'incubació, es va recollir per separat el medi de cultiu i les cèl·lules (aquestes en 1 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q), i es van emmagatzemar a -80°C fins a la seva posterior anàlisi.

## 2.5. Producció, purificació i titulació de vectors virals adenoassociats

### 2.5.1. Producció i purificació

Les partícules infectives de vectors virals AAV9 es van generar en cultius cel·lulars HEK-293 cultivats en *Roller bottles* (RB) (Greiner Bio-One) mitjançant el protocol de triple transfecció (Ayuso, 2010) que implica la utilització de 3 plasmidis (Figura 68). Aquest protocol basat en la precipitació dels virus mitjançant PEG i la ultracentrifugació amb gradients de CsCl permet eliminar pràcticament el contingut de càpsides buides i disminuir les impureses proteiques, augmentant d'aquesta manera la puresa de la preparació viral final, la qual cosa resulta en uns nivells de transducció *in vivo* més elevats (Ayuso, 2010).

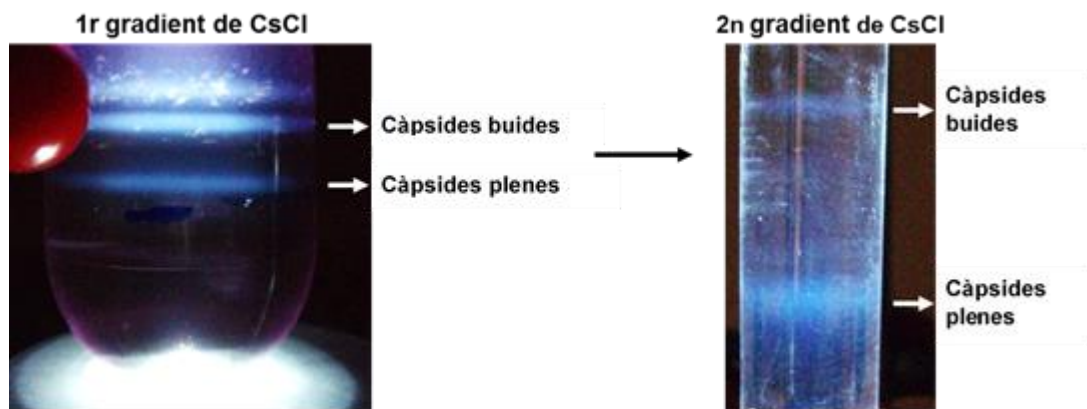
Les cèl·lules HEK293 es van cultivar fins a assolir una confluència d'aproximadament el 80% en el medi DMEM suplementat amb un 10% de FBS + 1% Penicil·lina/estreptomicina. La co-transfecció de cada RB es va dur a terme en 15 ml de PEI MAX (Polysciences) - DNA (en una proporció 2:1 p/p) en DMEM + 1% Penicil·lina/estreptomicina. La mescla de DNA consisteix en 20 µg del plasmidi d'interès (amb les seqüències ITR i la casset d'expressió, que conté el promotor CAG, el cds de la NPC2 murina optimitzada i la seqüència poliA), juntament amb 100 µg del plasmidi accessori pRep2Cap9 (plasmidi d'expressió codificant per les proteïnes de la càpsida proteica de les partícules virals i per les proteïnes necessàries per la replicació viral) i 100 µg del plasmidi pAdHelper (plasmidi d'expressió codificant per a les proteïnes adenovirals auxiliars necessàries) (Figura 68). El plasmidi pRep2Cap9 va ser cedit per la Dra. Katherine High del *Children's Hospital of Philadelphia*.



**Figura 68. Representació esquemàtica de la producció dels vectors virals AAV pel protocol de triple transfecció.** Per a la producció de vectors AAV, ambdós ORFs virals (rep i cap) són substituïts per la casset d'expressió flanquejada per les senyals d'empaquetament viral (ITRs). Les proteïnes virals rep i cap s'aporten en *trans* pel plasmidi accessori pRep2Cap9. Les funcions del virus auxiliars es proporcionen en *trans* mitjançant la transfecció d'un tercer plasmidi, anomenat plasmidi pAdHelper, codificant pels gens adenovirals necessaris per a la producció dels AAV (Adaptat de Büning, 2008).

A continuació, 72 hores post-transfecció, es van recollir i centrifugar les cèl·lules a 2500g durant 15 min a 4°C. El medi de cultiu es va guardar a 4°C. El *pellet* cel·lular es va reconstituir en tampó TMS (50mM TrisHCl, 150mM NaCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, pH 8.0) i es va sonicar per lisar les cèl·lules i alliberar els virus del seu interior. El lisat es va centrifugar a 2500g durant 30 min i el sobrenedant d'aquesta centrifugació es va afegir al medi de cultiu prèviament guardat a 4°C. A continuació, les partícules virals es van precipitar mitjançant una incubació de 15h en PEG 8000 al 8% (Sigma) a 4°C. Passat aquest període, els vectors es van precipitar per centrifugació a 4000g durant 30 min. Aquest nou *pellet*, que contenia els vectors virals tant del medi de cultiu com de les cèl·lules, va ser reconstituït amb TMS, tractat amb benzonasa (Merck) durant 1h a 37°C i finalment centrifugat a 10000g durant 10 min. El sobrenedant resultant es va carregar en tubs de 37.5 ml *Ultra clear* (Beckman) que contenien un gradient discontinu de CsCl de densitat 1.5 (5ml) i 1.3 g/ml (10ml). A continuació, van ser centrifugats durant 17 h a 27.000 rpm en un rotor SW28 (Beckman). Les bandes de virus (Figura 69) van ser

recollides mitjançant agulles de 18G i es van transferir a tubs *Ultra clear* de 12.5 ml. La resta del tub de 12.5 ml es va emplenar amb CsCl a 1.379 g/ml per tal de generar un gradient continu. Aquests tubs es van centrifugar a 38.000 rpm en un rotor SW40Ti (Beckman) durant 48 h (Figura 69). Finalment, es van recollir i dialitzar les bandes corresponents a les partícules virals plenes en PBS + 0.001% Plurònic F68 mitjançant una membrana de 10 kDa (Thermo Fisher Scientific), i posteriorment es van filtrar mitjançant filtres de 0.22 µm (Millipore).



**Figura 69. Purificació dels vectors AAV.** El primer gradient de CsCl permet separar els vectors que contenen el transgèn (càpsides plenes) de la majoria d'impureses i càpsides buides. El segon gradient permet separar els vectors que contenen el transgèn (càpsides plenes), de bona part de les impureses i càpsides buides. El segon gradient de CsCl permet separar les càpsides plenes, d'impureses de densitat similar a la de les càpsides plenes, d'espècies intermitjies i de càpsides buides. Adaptat d'Ayuso, 2010.

### 2.5.2. Titulació de genomes virals

La titulació dels genomes virals dels diferents lots de vectors AAV generats es va realitzar mitjançant el mètode del *PicoGreen* (Thermo Fisher Scientific). Per a comprovar la validesa dels resultats, es va quantificar paral·lelament un vector de referència de titulació coneguda. El *PicoGreen* és un fluorocrom d'alta sensibilitat que s'uneix al DNA de doble cadena, sent molt robust a la contaminació per proteïnes, DNA de cadena simple o RNA. Primer, es van lisar les càpsides per alliberar el DNA de cadena simple positiva i negativa encapsidat, de tal manera que puguin hibridar i generar el DNA de cadena doble. Es va utilitzar DNA de concentració coneguda (fag lambda) subministrat pel fabricant per a generar una corba de calibratge.

Per a assegurar que no es va sobreestimar el títol dels vectors a causa de contaminació amb DNA restant del procés de producció i purificació, es van processar

en paral·lel els vectors sense lisar. D'aquesta manera, es va poder quantificar el DNA no encapsidat i es va restar al títol obtingut del vector lisat.

Per a lisar les mostres, es van afegir 2 µl de cada preparació del vector viral a 8 µl de PBS + 0.001% Pluronic F68 i 10 µl de tampó de lisi (20 mM Tris-HCl, 200 mM NaCl i 0.2% SDS, pH 7.4). Posteriorment, es van incubar 1 h a 70°C. Paral·lelament, es va afegir 2 µl de les mostres no lisades de cada preparació del vector viral a 8 µl de PBS + 0.001% Pluronic F68 i 10 µl de tampó TE (10 mM Tris, 1mM EDTA, pH 8). Aquestes mostres es van mantenir a temperatura ambient. Finalment, es va afegir 180 µl de tampó TE als 20 µl de les mostres lisades i no lisades.

Es va fer una dilució seriada de DNA de referència amb el tampó TE per a generar una corba de calibració.

En una placa negra de 96 pous, es va afegir 180 µl de *PicoGreen* a una concentració 1X en tampó TE. Seguidament, es va afegir per triplicat 20 µl del DNA de referència, de les mostres lisades, de les mostres no lisades i dels blancs (tampó TE). El fluorocrom va ser excitat a 485 nm i la fluorescència va ser mesurada a 535 nm en el fluorímetre *Synergy HTX* (BioTek Instrument). El valor de fluorescència dels blancs (soroll de fons) es va restar a la resta de pous. A més a més, el valor de fluorescència de les mostres no lisades es va restar a les mostres lisades (on el genoma viral es troba en forma de doble cadena). El títol de les diferents produccions de vector (Taula 11) es va obtenir per interpolació de la fluorescència obtinguda a la regressió lineal de la fluorescència de la corba de calibració.

**Taula 11. Quantificació dels genomes virals**

Vector viral	Títol (vg/ml)
AAV9-CAG-omNpc2 (1a producció)	$1.21 \cdot 10^{13}$
AAV9-CAG-omNpc2 (2a producció)	$2.90 \cdot 10^{13}$
AAV9-CAG-omNpc2 (3a producció)	$1.09 \cdot 10^{14}$

### **2.5.3. Quantificació de partícules virals**

L'anàlisi per electroforesi en gels d'acrilamida SDS-PAGE i la tinció amb *Sypro Ruby* permet determinar la quantitat de càpsides produïdes. Aquest valor, juntament amb el nombre de genomes virals, permet saber el percentatge de càpsides buides (genomes virals/nombre de càpsides). Per altra banda, aquest mètode també és útil per

visualitzar el grau de contaminació amb altres proteïnes no virals, fet que en pot alterar la capacitat infectiva *in vivo*. El volum apropiat del vector d'interès i diferents dilucions d'un vector de referència de concentració coneguda es van barrejar amb Laemmli 4X a un volum final de 20 µl. Després d'incubar-los 5 min a 95°C, les mostres es van carregar a un gel d'acrilamida Bis-Tris de 15 mm i 15 pous (Thermo Fisher Scientific) i es van córrer a 120 V durant 2 h i 30 min. Les proteïnes es van fixar amb Metanol-Acètic. Posteriorment, es va incubar el gel en 100 ml de *Sypro Ruby Protein Gel Staining* (Thermo Fisher) fins al matí següent. Es van fer dos rentats del gel, primer en metanol-acètic i després en aigua Mili-Q. Finalment, es va mesurar la fluorescència de les proteïnes en un transil·luminador UV (Syngene). El títol de les partícules virals es va obtenir per densitometria. Es va generar una corba de calibració a partir de la intensitat de la proteïna VP3 en cada una de les dilucions del vector de referència, de la qual es va interpolar la concentració de les preparacions de vector analitzades.

## **2.6. Administració *in vivo* dels vectors AAV**

### **2.6.1. Administració intracisterna magna dels vectors AAV9 a ratolins**

L'administració intracisterna dels vectors virals AAV9 en ratolins es va realitzar sota anestèsia, mitjançant una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) i Xilacina (10 mg/kg). Un cop anestesiats, es va rasurar el pèl de la part posterior del cap, des de les orelles fins a aproximadament les escàpules, i es va realitzar una petita incisió de 2-3 mm a la zona corresponent al final del crani i inici de la columna vertebral, coincidint amb la línia mitjana. Els animals es van mantenir en posició de decúbit supí, amb el cap inclinat cap avall en un angle d'aproximadament 60° respecte l'horitzontal. Seguint el mateix angle d'inclinació, es va introduir una agulla de 34G unida a una xeringa *Hamilton* (Hamilton Company) per tal d'accedir a la cisterna magna a través del *foramen magnum*. A continuació, es va administrar 5 µl del vector viral a la dosi escollida al LCR a través de la cisterna magna. Degut al fet que el SNC era el principal compartiment diana del vector viral, tots els ratolins van ser administrats amb una quantitat total de genomes virals fixa ( $5 \times 10^{10}$ vg o  $1 \times 10^{11}$ vg), independentment del gènere o del pes corporal. Un cop administrat el vector viral, es va retirar l'agulla de la cisterna i la incisió a la pell es va segellar amb l'adhesiu tissular *Histoacryl*® (B. Braun).

### **2.6.2. Administració intravenosa dels vectors AAV9 a ratolins**

L'administració intravenosa dels vectors virals AAV9 a ratolins es va realitzar a través d'una de les dues venes caudals laterals de la cua. Per a immobilitzar els animals durant l'administració, es va utilitzar un *restrainer* (Harvard Apparatus). Els vectors virals van ser diluïts a la concentració requerida amb PBS + 0.001% Pluronic F68 en un volum final de 200 µL i administrats utilitzant una agulla de 26G. Per a facilitar la injecció, es va exposar els ratolins a llum infraroja de 250 W (Philips) durant uns minuts per a induir la vasodilatació.

### **2.7. Eutanàsia i obtenció de mostres biològiques *post mortem* de ratolins**

Al moment del sacrifici, els ratolins van ser anestesiats mitjançant una injecció intraperitoneal de Ketamina (100 mg/kg) i Xilacina (10 mg/kg). A continuació, i sota els efectes de l'anestèsia, es va obtenir sang per punció intracardíaca del ventricle esquerre, que es va mantenir a 4°C fins que va ser processada. Posteriorment, els ratolins es van perfondre amb 12 ml de PBS a través del ventricle esquerre, per tal d'eliminar la sang dels vasos sanguinis dels diferents teixits i evitar així la seva possible interferència en les posteriors determinacions. Un cop perfosos, es va procedir a l'extracció dels diferents òrgans i teixits. En el cas del cervell, aquest es va dividir longitudinalment en els dos hemisferis (dret i esquerre) i cadascun d'ells alhora es va subdividir en 5 regions coronals més, essent la regió "I" la més frontal i la regió "V" la més caudal (Figura 70). Tots els fragments de cervell i la resta de teixits disseccionats es van mantenir a -80°C fins al seu processament. Una part de cadascun dels teixits (en el cas del cervell, un hemisferi sencer) també va ser immersa *o/n* en paraformaldehid al 4% per tal de realitzar-ne la seva posterior inclusió en blocs de parafina o bé en OCT que, seguidament, es van congelar a -80°C. Les mostres de sang es van centrifugar a 6000 g a 8°C durant 10 min. El sobrenedant, el sèrum, es va transferir a un nou tub i es va mantenir a -80°C fins al seu processament.

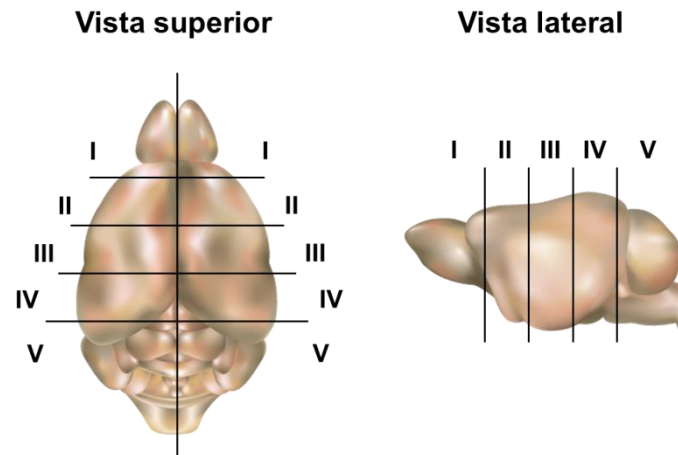


Figura 70. Subdivisió del cervell murí en diferents parts per a posteriors determinacions.

## 2.8. Quantificació de genomes virals als teixits

Per a quantificar els genomes virals del vector AAV9-*omNpc2*, es va extreure el DNA amb el *MasterPure™ DNA Purification Kit* (Lucigene), seguint les instruccions del fabricant. Breument, es van digerir uns 5 mg de teixit en 300 µl de tampó XX amb proteïnasa K a 56°C *o/n*. Per a degradar el RNA, es va afegir RNAsa A i es va incubar a 37°C durant 30 min. Posteriorment, es van precipitar les restes cel·lulars (lípid i proteïnes) amb el MPC protein per centrifugació. El sobrenedant, que contenia el DNA, es va precipitar amb isopropanol i després dels rentats amb etanol es va resuspendre en un volum adequat d'H<sub>2</sub>O Milli-Q segons/depenent el teixit.

La quantificació dels genomes virals es va realitzar mitjançant una qPCR amb una sonda TaqMan (Taula 12) per a detectar la seqüència *omNpc2* amb el *kit LightCycler® 480 Probe Master* (Roche), segons les condicions del fabricant. La quantificació es va realitzar per extrapolació d'una corba de calibratge amb concentracions conegudes del vector de producció pAAV-CAG-*omNpc2*.

Taula 12. Seqüències dels oligonucleòtids utilitzats a TaqMan.

Gen	Seqüències (5'→3')
<i>omNpc2</i>	<b>Forward</b> GGTAGCTGTACACCTTGTCTTT
	<b>Reverse</b> CAGAGTGCCCTTCCAATC
	<b>Sonda</b> 56-FAM/CTGCAAGAG/ZEN/CGGCATCAACTGC/3IABkFQ



## 2.9. Western blot

### 2.9.1. Quantificació del contingut proteic pel mètode del BCA

Per tal de quantificar el contingut proteic tant dels extractes cel·lulars dels cultius HEK-293 com dels extractes de teixits analitzats per *Western blot*, es va utilitzar el mètode de l'àcid bicinconínic (BCA) (Thermo Fisher Scientific). Aquest mètode està basat en la reducció de cations  $\text{Cu}^{2+}$  a  $\text{Cu}^{+1}$  en presència de proteïnes a causa de la reacció de biuret. Els ions  $\text{Cu}^{+1}$  són quelats pel BCA i produeixen un complex amb un màxim d'absorbància a 562 nm.

Per a obtenir els extractes proteics, es va homogeneïtzar per sonicació les mostres de cervell i fetge (uns 50 mg) en 300 o 500  $\mu\text{l}$ , respectivament, de tampó de lisi (Tris 50 mM pH 7.5, sucrosa 0.27 M, EGTA 1 mM, EDTA 1 mM, NaF 50 mM, Na- $\beta$ -glicolfosfat 10 mM, Ppi 5 mM, Tritó X-100 1%) suplementat amb un inhibidor de proteases (*Complete*<sup>®</sup>, 1 pastilla/50 ml) (*Roche*). En el cas dels cultius cel·lulars, les cèl·lules recollides dels pous de plaques de 6 pous van ser sonicades en 1 ml de tampó de lisi. Els extractes sonicats es van centrifugar a 10.000g durant 10 min a 4°C i es va recuperar el sobrenedant. En una placa transparent, es va carregar per duplicat 25  $\mu\text{l}$  d'una dilució apropiada en tampó de lisi de les mostres. La corba de calibratge es va realitzar amb diferents quantitats (0-20  $\mu\text{g}$ ) d'albumina sèrica bovina (BSA, *Bovine serum albumin*), també per duplicat. Posteriorment, es va afegir 200  $\mu\text{l}$  del reactiu de BCA i es va incubar 30 min a 37°C. Finalment, es va mesurar l'absorbància de les mostres i la recta patró en un espectrofotòmetre *Synergy HTX* (*BioTek Instruments*) a 562 nm. Els valors d'absorbància dels blancs (soroll de fons) es van restar als valors de la recta patró i les mostres. La concentració proteica de les mostres es va determinar per extrapolació de la regressió lineal de la recta patró de BSA.

### 2.9.2. Electroforesi en gels d'acrilamida (SDS-PAGE)

L'expressió proteica es va analitzar per electroforesi en gels d'acrilamida de dues fases en presència de SDS. La part superior del gel, l'*stacking gel* (3.2 % p/v acrilamida/bisacrilamida, 0.125 M Tris-HCl, 0.1 % p/v SDS, 2.7 % v/v TEMED, 1.3% p/v Persulfat d'amoni), conté una baixa concentració d'acrilamida per a permetre l'apilament i compactament de les proteïnes en una única banda. A sota, el *resolving gel* (12 % w/v acrilamida/bisacrilamida, 0.375 M Tris-HCl, 0.1 % p/v SDS, 0.02 % p/v persulfat d'amoni, 0.01 % v/v TEMED) permet la correcta separació de les proteïnes per pes molecular. Abans de carregar-les al gel d'acrilamida, les mostres proteiques (entre 10 i 30  $\mu\text{g}$ ) es

van incubar en 0.2 volums de tampó de càrrega Laemli 6x (20 mM tampó fosfat pH 7, 30% v/v glicerol, 4 % w/v SDS, 2 % v/v  $\beta$ -mercaptoetanol, amb blau de bromofenol) a 95°C durant 3 min. L'electroforesis es va dur a terme a 100 V durant 1.5-2 h en tampó d'electroforesis (25 mM Tris, 200 mM glicina, 0.1 % w/v SDS). Per a facilitar la identificació de les bandes, es va utilitzar un marcador de pes molecular pre-tenyit de rang ampli (Thermo Fisher Scientific).

### **2.9.3. Electrotransferència de les proteïnes a la membrana de PVDF**

L'electrotransferència de les proteïnes des del gel d'acrilamida a les membranes de PVDF *Immobilon-P* (Millipore) es va realitzar en el tampó de transferència (25 mM Tris, 150 mM glicina, 20% v/v metanol) 1.5 h a 100 V a 4°C. Prèviament, es van activar les membranes de PVDF en metanol i es van equilibrar en el tampó de transferència. Es va comprovar la correcta transferència de les proteïnes mitjançant la tinció amb *ponceau*, un colorant que s'uneix de forma reversible a les proteïnes. Finalment, si les membranes s'havien d'utilitzar al moment es deixaven en tampó TBS (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl); en cas contrari, es rentaven 5 s amb metanol i s'eixugaven.

### **2.9.4. Incubació i revelat**

Abans de la incubació amb els anticossos, es va bloquejar la membrana en *blotto* 10% (10% p/v de llet en pols desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) a temperatura ambient una hora. La incubació amb l'anticòs primari es va realitzar a una dilució concreta en *blotto* 5% (5% p/v de llet en pols desnatada, 25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20) a temperatura ambient durant 1 h o a 4°C o/n. Posteriorment, es van fer 2 rentats ràpids i 2 rentats de 5 min amb TBS-T 0.05% (25 mM Tris-HCl, 137 mM NaCl, 0.05% Tween 20). La incubació amb l'anticòs secundari unit a la peroxidasa es va realitzar a temperatura ambient durant 1 h, també diluït en *blotto* 5%, i seguidament es van realitzar 2 rentats ràpids i 2 rentats de 10 min amb TBS-T 0.05% i un final de 5 min en TBS. A continuació, es va procedir a la immunodetecció mitjançant el producte comercial *Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate* (Millipore), segons les especificacions del fabricant. Finalment, es va exposar un film fotosensible a les membranes per a la visualització de la senyal. La quantificació de les bandes es va realitzar per densitometria, utilitzant el programari lliure *ImageJ* (NIH).

## 2.10. Determinació de les activitats enzimàtiques

### 2.10.1. Quantificació del contingut proteic pel mètode del Bradford

El contingut proteic dels extractes cel·lulars o dels teixits on s'havia de determinar les activitats enzimàtiques es va realitzar amb el mètode de Bradford. Aquest mètode està basat en el canvi de color que experimenta el colorant *Coomassie brilliant blue* quan s'uneix a les proteïnes, que passa d'un pic d'absorbància de 495 nm a 595 nm.

Per a produir els extractes proteics, es va homogeneïtzar per sonicació els diversos teixits en 200-500 µl d'H<sub>2</sub>O Milli-Q o les cèl·lules en 500 µl d'H<sub>2</sub>O Milli-Q. Un cop sonicades, les mostres es van centrifugar a 10.000 g a 4°C durant 10 min i es va recuperar el sobrenedant. Posteriorment, es va preparar per duplicat una dilució apropiada dels extractes proteics en H<sub>2</sub>O Milli-Q en un volum final de 800 µl i s'hi va afegir 200 µl del reactiu de Bradford (*Bio-Rad Protein Assay*, Bio-Rad). La corba de calibratge es va preparar per duplicat amb 0-20 µg de BSA. Després de 5 minuts d'incubació, es van transferir 200 µl de la corba de calibratge o dels extractes proteics diluïts a una placa transparent de 96 pous. La mesura de l'absorbància es va realitzar a 595 en un espectrofotòmetre Synergy HTX (BioTek Instruments). La concentració dels extractes proteics es va calcular a partir de l'extrapolació dels valors de la recta de calibratge.

## 2.11. Determinació de l'activitat β-HEXO i HGSNAT

Les activitats enzimàtiques es van determinar utilitzant substrats comercials conjugats a la 4-metilumbeliferona (4MU), un compost fluorescent. El fonament de la tècnica consisteix en la hidròlisi del substrat gràcies a l'activitat enzimàtica que resulta en l'alliberació de la 4MU. La 4MU només emet fluorescència quan no es troba unida al substrat. Les condicions es detallen a la Taula 13. Breument, una quantitat determinada de proteïna total dels corresponents extractes proteics o una dilució determinada de les mostres de sèrum es van incubar a 37°C juntament amb el substrat diluït en el tampó apropiat. Transcorregut el temps d'incubació, la reacció enzimàtica es va aturar amb l'addició de 200 µl de tampó *stop* alcalí (0,5M NaHCO<sub>3</sub> / 0,5 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 10,7 + 0,025% de Tritó X-100), i la fluorescència emesa es va llegir en un espectrofotòmetre *Synergy HTX* (BioTek Instruments) utilitzant un filtre d'excitació 360/40 nm i un filtre d'emissió 460/40 nm. L'activitat es va calcular per extrapolació de la fluorescència detectada amb una recta patró formada per dilucions seriades de 4MU i es va normalitzar per la quantitat de proteïna total carregada.

Taula 13. Condicions de l'activitat  $\beta$ -HEXO i HGSNAT.

Enzim	Mostra	Substrat	Tampó del substrat	Incubació	Tampó stop	Casa comercial
$\beta$ -HEXO	0.1 $\mu$ g (teixit) 0.1 $\mu$ l (sèrum)	MU- $\beta$ GlcNAc	0.2 M Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / 0.1 M àcid cítric pH 4.4	1 h, 37°C	0.5 M NaHCO <sub>3</sub> / 0.5 M Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> + Tritó 0.025% pH 10.7	Sigma
HGSNAT	30 $\mu$ g (teixit)	MU- $\beta$ GlcNH <sub>2</sub> + AcCoA		17 h, 37°C		Carbosynth i Sigma

## 2.12. Immunohistoquímica de seccions tissulars en blocs de parafina

Els teixits es van mantenir en formol al 4% durant 12h - 24h, van ser inclosos en blocs de parafina i finalment se'n van fer talls histològics amb un micròtom *Leica RM2135* (Leica Biosystems). Les seccions tissulars es van desparafinar amb 2 rentats de xilol i rehidratar amb un gradient d'etanol al 100% i 96% i PBS. Els anticossos que requerien recuperació d'epítops, segons indicacions del fabricant, es van tractar amb tampó citrat amb una olla a pressió. Posteriorment, es va inhibir la peroxidasa endògena amb Metanol al 30 % en PBS i 1% d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 30% durant 30 min i es van fer 3 rentats de 5 min amb PBS. A continuació, es va incubar *o/n* a 4°C amb els anticossos primaris específics (Apartat 1.3), es van fer 3 rentats amb PBS de 5 min i finalment es van incubar amb el corresponent anticòs secundari (Apartat 1.3) durant 1h a temperatura ambient. El revelat es va dur a terme amb el reactiu *ABC Complex* (Vector Laboratories), el qual empra 3,3'-diaminobenzidina (DAB) com a cromogen. Les imatges en camp clar es van obtenir amb un microscopi òptic *Eclipse 90i* (Nikon Instruments).

## 2.13. Determinació de l'àrea positiva de les immunohistoquímiques de camp clar

Es va utilitzar el programari *NIS Elements Advanced Research 2.20* (Nikon) per quantificar la senyal positiva contra LIMP2, GFAP i BSIB4 de les anàlisis immunohistoquímiques de l'encèfal en 3 - 5 imatges representatives (magnificació original 20x) de cada zona, mantenint els mateixos paràmetres per a tots els animals. El percentatge d'àrea amb marcatge positiu es va calcular com a àrea positiva (en píxels) de cada marcatge envers l'àrea total de la imatge.

## 2.14. Tinció amb complex de filipina

Els teixits es van mantenir almenys 17 hores en PFA 4%. Després de la fixació, es van deshidratar les mostres amb sucrosa al 30% en PBS durant 48 hores a 4°C

(renovant la solució de sucrosa cada 24 hores). Posteriorment, es van incloure en la matriu d'inclusió M-1 (Thermo Fisher Scientific) i es van solidificar els blocs submergint-los en isopentà refredat en N<sub>2</sub> líquid. Els blocs es van mantenir a -80°C fins al seu processament. Al moment de processar els teixits, es van introduir al criòstat a una temperatura de -15°C per a equilibrar la temperatura. Es van tallar almenys 2 seccions de 14 µm per mostra i es van unir per contacte al portaobjectes Superfrost Excell (Thermo Fisher Scientific). Posteriorment, es van deixar 1 h a temperatura ambient per a eixugar-se adequadament i assegurar-ne la unió al portaobjectes.

Per a dur a terme la tinció amb filipina, es van rehidratar els portaobjectes amb 3 rentats de PBS de 5 minuts. Seguidament, es van tornar a fixar en PFA 4% durant 45 min. Després de 3 rentats de 5 minuts en PBS, es va incubar els portaobjectes amb una solució de complex de filipina (0.05 mg/ml en PBS amb 10% FBS) a les fosques durant 2 h. Finalment, es van fer 3 rentats de 5 min en PBS i es van muntar els portaobjectes utilitzant *Vectashield* (Vector Labs), sempre a les fosques.

Per a obtenir les imatges de fluorescència, es va utilitzar un microscopi Eclipse 90i (Nikon) amb un filtre UV.

### **2.15. Microscòpia electrònica de transmissió**

Per tal d'obtenir les mostres per a MET es va anestesiar els ratolins amb ketamina (100 mg/kg) i xilacina (10 mg/kg) intraperitoneal, es va extreure la sang per punció intracardíaca i es van perfondre amb tampó fosfat sòdic 0.1 M (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>). Una porció d'aproximadament 1 mm<sup>3</sup> de cada teixit es va disseccionar, rentar amb tampó fosfat sòdic i es va fixar amb glutaraldehyd al 2.5% a 4°C. A continuació, els teixits es van rentar amb tampó fosfat 0.1 M i es van fixar amb tetraòxid d'osmi al 1% en tampó fosfat. Seguidament, es van deshidratar amb dilucions seriades d'etanol i es van fixar en resina epoxídica. Els talls semifins (500 nm) es van tenyir amb blau de toluídina al 1% en solució aquosa. Els talls ultrafins (60-80 nm) es van muntar en una reixeta de coure i es van contrastar amb acetat d'uranil i citrat de plom. La visualització es va realitzar amb el microscopi electrònic de transmissió JEM-2011 (JEOL).

### **2.16. Determinació del contingut de colesterol al sèrum i als teixits**

Per a l'extracció de lípids dels teixits, es va partir d'uns 100 mg de teixit, els quals van ser homogeneïtzats en 15 ml cloroform-metanol (2:1) en un politró i seguidament

s'hi va afegir 3 ml H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.05%. Els tubs es van agitar vigorosament i es va separar la fase aquosa i l'orgànica deixant-los a 4°C *o/n*. El dia següent, es va recuperar 1 ml de la fase orgànica, s'hi va afegir 1 volum de tritó X-100 1% en cloroform i es va deixar evaporar la totalitat del volum a 90°C. Per tal de recollir els possibles lípids enganxats a la paret del tub, es va afegir 1 ml de cloroform i es va evaporar a 90°C, procés que es va repetir una segona vegada. Un cop evaporat, es va resuspendre el pellet en 0.5 ml d'H<sub>2</sub>O Milli-Q. Les mostres es van mantenir a -80°C fins al seu processament.

La determinació del colesterol total es va realitzar a les mostres de sèrum o als extractes lipídics dels teixits mitjançant el *kit ABX Pentra Cholesterol CP* (Horiba) amb l'analitzador *Pentra 400* (Horiba).

## **2.17. Determinació de la transaminasa AST al sèrum**

L'activitat AST es va mesurar a les mostres de sèrum amb el *kit ABX Pentra AST CP* (Horiba) amb l'analitzador *Pentra 400* (Horiba), seguint les especificacions del fabricant.

## **2.18. Proves de comportament**

### **2.18.1. Actímetre**

L'activitat locomotora dels ratolins es va avaluar entre les 9 i les 14 h. Els animals es van situar a l'interior d'una arena amb parets transparents de metacrilat de 41x41x30 cm. Els ratolins es col·locaven a la cantonada inferior dreta, mirant cap a l'interior. L'arena estava subdividida virtualment en 3 zones concèntriques i equidistants: el centre, la perifèria i la vora (que correspon a tot l'espai excepte el centre). Una càmera digital enregistrava el moviment dels ratolins durant 10 minuts. Els diferents paràmetres del test es van analitzar amb el software *SMART v3* (Panlab) i es van tenir en compte els 3 primers minuts de la prova, excepte la velocitat màxima i la latència d'entrada al centre que es van avaluar durant la totalitat de la prova (10 min).

### **2.18.2. Rotarod**

La prova del *rotarod* (*LE 8200*, Panlab) es va realitzar per avaluar la coordinació dels ratolins. Primerament, a 1 mes d'edat, es va aclimatar els ratolins a la prova col·locant-los sobre el *rotarod* sense rotació. Cada mes, es va realitzar la prova del

*rotarod* 2 dies seguits, amb 3 intents per dia. La prova consistia en situar els ratolins sobre del *rotarod* a una velocitat de 4 rpm, que s'accelerava fins a les 40 rpm en 60 s. Es va anotar el temps que trigava cada ratolí a caure, que com a màxim estava limitat a 90 s. Si el ratolí es girava, es considerava l'intent nul i es repetia posteriorment. Entre intents, es deixava descansar els ratolins com a mínim 5 minuts. Per a l'anàlisi dels resultats, es va tenir en compte el valor màxim per mes.

### **2.18.3. Mesh test**

La prova del *Mesh test* es va realitzar per avaluar la coordinació i la força dels ratolins. Consisteix en un marc de fusta de 45x45 cm amb una reixa metàl·lica d'1cm de quadrícula. Els ratolins es van col·locar damunt de la reixa, mirant cap a l'exterior, i es va invertir la reixa un 2 s. Es va anotar el temps que trigaven a caure de la reixa, amb un màxim de 60 s. Si el ratolí no queia, s'anotava el valor de 60 s. Es deixava descansar els ratolins com a mínim 5 minuts entre intents. Aquesta prova es feia per triplicat i es calculava la mitjana dels 3 intents.

## **2.19. Anàlisi estadística**

Els resultats es van expressar com la mitjana  $\pm$  SEM. Les comparacions estadístiques es van dur a terme mitjançant la prova de la *t* de Student no aparellada i de doble via quan es comparaven 2 grups experimentals. Quan hi havia més de dos grups experimentals, es va realitzar l'anàlisi de la variància d'un factor (ANOVA) seguides del post-test de Dunnet (si es comparava tots els grups experimentals amb el grup control) o del post-Test de Tukey (si es comparava tots els grups experimentals entre ells). El mètode de *Kaplan-Meier* es va utilitzar per a la mesura de la supervivència, i el *log-rank test*, per a les respectives comparacions múltiples. Per a l'anàlisi de les proporcions genotípiques, es va realitzar la prova de la  $X^2$  amb 2 graus de llibertat. Les proves estadístiques es van realitzar amb el programa *Prism 7* (GraphPad). La significança estadística es va determinar quan  $p < 0.05$ .

## ***VIII. Bibliografia***





- Amritraj, A, Peake, K, Kodam, A, Salio, C, ... Kar, S. (2009). "Increased activity and altered subcellular distribution of lysosomal enzymes determine neuronal vulnerability in Niemann-Pick type C1-deficient mice." *American Journal of Pathology*, 175(6), 2540–2556.
- Appelqvist, H, Wäster, P, Kågedal, K, & Öllinger, K. (2013). "The lysosome: From waste bag to potential therapeutic target." *Journal of Molecular Cell Biology*, 5, 214–226.
- Atchison, RW, Casto, BC, & Hammon, WMD. (1965). "Adenovirus-associated defective virus particles." *Science*, 149(3685), 754–756.
- Ayuso, E, Mingozzi, F, Montane, J, Leon, X, ... Wright, JF. (2010). "High AAV vector purity results in serotype- and tissue-independent enhancement of transduction efficiency." *Gene Therapy*, 17(4), 503–510.
- Baguña Torres, J, Yu, Z, Bordoloi, J, Sunassee, K, ... Blower, PJ. (2019). "Imaging of changes in copper trafficking and redistribution in a mouse model of Niemann-Pick C disease using positron emission tomography." *BioMetals*, 32(2), 293–306.
- Bainbridge, JWB, Mehat, MS, Sundaram, V, Robbie, SJ, ... Ali, RR. (2015). "Long-term effect of gene therapy on Leber's congenital amaurosis." *New England Journal of Medicine*, 372(20), 1887–1897.
- Balakrishnan, B, & Jayandharan, G. (2014). "Basic Biology of Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors Used in Gene Therapy." *Current Gene Therapy*, 14(2), 86–100.
- Ballabio, A, & Gieselmann, V. (2009). "Lysosomal disorders: from storage to cellular damage." *Biochimica et Biophysica Acta*, 1793(4), 684–96.
- Berridge, MJ. (2010). "Calcium hypothesis of Alzheimer's disease." *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 459(3), 441–449.
- Beshlawy, A El, Murugesan, V, Mistry, PK, & Eid, K. (2019). "Reversal of life-threatening hepatopulmonary syndrome in Gaucher disease by imiglucerase enzyme replacement therapy." *Molecular Genetics and Metabolism Reports*, 20, 100490.
- Bey, K, Deniaud, J, Dubreil, L, Joussemet, B, ... Colle, MA. (2020). "Intra-CSF AAV9 and AAVrh10 Administration in Nonhuman Primates: Promising Routes and Vectors for Which Neurological Diseases?" *Molecular Therapy - Methods and Clinical Development*, 17, 771–784.
- Bianconi, SE, Hammond, DI, Farhat, NY, Dang Do, A, ... Porter, FD. (2019). "Evaluation of age of death in Niemann-Pick disease, type C: Utility of disease support group websites to understand natural history." *Molecular Genetics and Metabolism*, 126(4), 466–469.
- Biffi, A. (2016). "Gene therapy for lysosomal storage disorders: a good start." *Human Molecular Genetics*, 25(1), 65–75.
- Birnboim, HC, & Doly, J. (1978). "A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA." *Nucleic Acids Research*, 7(6), 1513–1523.
- Bonney, DK, O'Meara, A, Shabani, A, Imrie, J, ... Wynn, RF. (2010). "Successful allogeneic bone marrow transplant for Niemann-Pick disease type C2 is likely to be associated with a severe 'graft versus substrate' effect." *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 33(S3), 171–173.
- Bonnot, O, Klünemann, HH, Velten, C, Torres Martin, JV, & Walterfang, M. (2019). "Systematic review of psychiatric signs in Niemann-Pick disease type C." *World Journal of Biological Psychiatry*, 20(4), 320–332.

- Bradl, M, & Lassmann, H. (2010). "Oligodendrocytes: Biology and pathology." *Acta Neuropathologica*, 119(1), 37–53.
- Brady, RO, Kanfer, JN, Mock, MB, & Fredrickson, DS. (1966). "The metabolism of sphingomyelin. II. Evidence of an enzymatic deficiency in Niemann-Pick disease." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 55(2), 366–369.
- Bräuer, AU, Kuhla, A, Holzmann, C, Wree, A, & Witt, M. (2019). "Current challenges in understanding the cellular and molecular mechanisms in niemann-pick disease type C1." *International Journal of Molecular Sciences*, 20(18), 4392–4411.
- Braulke, T, & Bonifacino, JS. (2009). "Sorting of lysosomal proteins." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), 605–614.
- Breiden, B, & Sandhoff, K. (2020). "Mechanism of secondary ganglioside and lipid accumulation in lysosomal disease." *International Journal of Molecular Sciences*, 21(7), 2566–2596.
- Buchlis, G, Podsakoff, GM, Radu, A, Hawk, SM, ... High, KA. (2012). "Factor IX expression in skeletal muscle of a severe hemophilia B patient 10 years after AAV-mediated gene transfer." *Blood*, 119(13), 3038–3041.
- Büning, H, Ried, MU, Perabo, L, Gerner, FM, ... Hallek, M. (2003). "Receptor targeting of adeno-associated virus vectors." *Gene Therapy*, 10(14), 1142–1151.
- Cachón-González, MB, Wang, SZ, Ziegler, R, Cheng, SH, & Cox, TM. (2014). "Reversibility of neuropathology in tay-sachs-related diseases." *Human Molecular Genetics*, 23(3), 730–748.
- Calias, P. (2018). "2-Hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrins and the Blood-Brain Barrier: Considerations for Niemann-Pick Disease Type C1." *Current Pharmaceutical Design*, 23(40), 6231–6238.
- Carstea, ED, Morris, JA, Coleman, KG, Loftus, SK, ... Tagle, DA. (1997). "Niemann-Pick C1 Disease Gene: Homology to Mediators of Cholesterol Homeostasis." *Science*, 277, 228–231.
- Chandler, RJ, Williams, IM, Gibson, AL, Davidson, CD, ... Purpura, DP. (2017). "Systemic AAV9 gene therapy improves the lifespan of mice with Niemann-Pick disease, type C1." *Human Molecular Genetics*, 26(1), 52–64.
- Cheruku, SR, Xu, Z, Dutia, R, Lobel, P, & Storch, J. (2006). "Mechanism of cholesterol transfer from the Niemann-Pick type C2 protein to model membranes supports a role in lysosomal cholesterol transport." *Journal of Biological Chemistry*, 281(42), 31594–31604.
- Chevallier, J, Chamoun, Z, Jiang, G, Prestwich, G, ... Gruenberg, J. (2008). "Lysobisphosphatidic acid controls endosomal cholesterol levels." *Journal of Biological Chemistry*, 283(41), 27871–27880.
- Chikh, K, Vey, S, Simonot, C, Vanier, MT, & Millat, G. (2004). "Niemann-Pick type C disease: importance of N-glycosylation sites for function and cellular location of the NPC2 protein." *Molecular Genetics and Metabolism*, 83(3), 220–230.
- Chikh, K, Rodriguez, C, Vey, S, Vanier, MT, & Millat, G. (2005). "Niemann-Pick type C disease: Subcellular location and functional characterization of NPC2 proteins with naturally occurring missense mutations." *Human Mutation*, 26(1), 20–28.
- Chira, S, Jackson, CS, Oprea, I, Ozturk, F, ... Berindan-Neagoe, I. (2015). "Progresses towards safe and efficient gene therapy vectors." *Oncotarget*, 6(31), 30675–30703.

- Crocker, AC, & Farber, S. (1958). "Niemann-Pick disease: A review of eighteen patients." *Medicine (United States)*, 37(1), 1–95.
- Crumling, MA, Liu, L, Thomas, P V., Benson, J, ... Duncan, RK. (2012). "Hearing Loss and Hair Cell Death in Mice Given the Cholesterol-Chelating Agent Hydroxypropyl- $\beta$ -Cyclodextrin." *PLoS ONE*, 7(12), 1-8(e53280).
- Cunningham, SC, & Alexander, IE. (2019). "AAV-mediated gene delivery to the mouse liver." *Methods in Molecular Biology*, 1937, 213–219.
- Cupidi, C, Frangipane, F, Gallo, M, Clodomi, A, ... Bruni, AC. (2016). "Role of Niemann-Pick Type C Disease Mutations in Dementia." *Journal of Alzheimer's Disease*, 55(3), 1249–1259.
- Dai, S, Dulcey, AE, Hu, X, Wassif, CA, ... Zheng, W. (2017). "Methyl- $\beta$ -cyclodextrin restores impaired autophagy flux in Niemann-Pick C1-deficient cells through activation of AMPK." *Autophagy*, 13(8), 1435–1451.
- Davidson, CD, Fishman, YI, Puskás, I, Szemán, J, ... Dobrenis, K. (2016). "Efficacy and ototoxicity of different cyclodextrins in Niemann-Pick C disease." *Annals of Clinical and Translational Neurology*, 3(5), 366–380.
- Davidson, CD, Ali, NF, Micsenyi, MC, Stephney, G, ... Walkley, SU. (2009). "Chronic Cyclodextrin Treatment of Murine Niemann-Pick C Disease Ameliorates Neuronal Cholesterol and Glycosphingolipid Storage and Disease Progression." *PLoS ONE*, 4(9), 1-15(e6951).
- Davidson, CD, & Walkley, SU. (2010). "Niemann-Pick Type C Disease—Pathophysiology and Future Perspectives for Treatment." *US Neurology*, 06(01), 88–94.
- De Duve, C, Pressman, BC, Gianetto, R, Wattiaux, R, & Appelmans, F. (1955). "Tissue fractionation studies. 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat-liver tissue." *The Biochemical Journal*, 60(4), 604–617.
- Di Rocco, M, Rossi, A, Parenti, G, Allegri, AEM, ... Biancheri, R. (2005). "Different molecular mechanisms leading to white matter hypomyelination in infantile onset lysosomal disorders." *Neuropediatrics*, 36(4), 265–269.
- Dietschy, JM. (2009). "Central nervous system: Cholesterol turnover, brain development and neurodegeneration." *Biological Chemistry*, 390(4), 287–293.
- Disbrow, GL, Sunitha, I, Baker, CC, Hanover, J, & Schlegel, R. (2003). "Codon optimization of the HPV-16 E5 gene enhances protein expression." *Virology*, 311(1), 105–114.
- Dong, S, & Hughes, RC. (1997). "Macrophage surface glycoproteins binding to galectin-3 (Mac-2-antigen)." *Glycoconjugate Journal*, 14(2), 267–274.
- Du, H, Heur, M, Duanmu, M, Grabowski, GA, ... Mishra, J. (2001). "Lysosomal acid lipase-deficient mice: depletion of white and brown fat, severe hepatosplenomegaly, and shortened life span." *Journal of Lipid Research*, 42(4), 489–500.
- Dzięgiel, P, Owczarek, T, Plażuk, E, Gomukiewicz, A, ... Ugorski, M. (2010). "Ceramide galactosyltransferase (UGT8) is a molecular marker of breast cancer malignancy and lung metastases." *British Journal of Cancer*, 103(4), 524–531.
- Eckhardt, M. (2008). "The role and metabolism of sulfatide in the nervous system." *Molecular Neurobiology*, 37(2–3), 93–103.
- Erickson, RP, Garver, WS, Camargo, F, Hossain, GS, & Heidenreich, RA. (2000).

- “Pharmacological and genetic modifications of somatic cholesterol do not substantially alter the course of CNS disease in Niemann-Pick C mice.” *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 23(1), 54–62.
- Evans, WRH, & Hendriksz, CJ. (2017). “Niemann-Pick type C disease – the tip of the iceberg? A review of neuropsychiatric presentation, diagnosis and treatment.” *BJPsych Bulletin*, 41(2), 109–114.
- Fan, M, Sidhu, R, Fujiwara, H, Tortelli, B, ... Ory, DS. (2013). “Identification of Niemann-Pick C1 disease biomarkers through sphingolipid profiling.” *Journal of Lipid Research*, 54(10), 2800–2814.
- Fancello, T, Dardis, A, Rosano, C, Tarugi, P, ... Filocamo, M. (2009). “Molecular analysis of NPC1 and NPC2 gene in 34 Niemann-Pick C Italian Patients: Identification and structural modeling of novel mutations.” *Neurogenetics*, 10(3), 229–239.
- Faust, PL, & Kovacs, WJ. (2014). “Cholesterol biosynthesis and ER stress in peroxisome deficiency.” *Biochimie*.
- Friedland, N, Liou, HL, Lobel, P, & Stock, AM. (2003). “Structure of a cholesterol-binding protein deficient in Niemann-Pick type C2 disease.” *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(5), 2512–2517.
- Fu, R, Yanjanin, NM, Bianconi, S, Pavan, WJ, & Porter, FD. (2010). “Oxidative stress in Niemann-Pick disease, type C.” *Molecular Genetics and Metabolism*, 101(2–3), 214–218.
- Futerman, AH, & Van Meer, G. (2004). “The cell biology of lysosomal storage disorders.” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(7), 554–565.
- Geberhiwot, T, Moro, A, Dardis, A, Ramaswami, U, ... Patterson, M. (2018). “Consensus clinical management guidelines for Niemann-Pick disease type C.” *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(50), 1–19.
- George, LA, Ragni, M V., Rasko, JEJ, Raffini, LJ, ... High, KA. (2020). “Long-Term Follow-Up of the First in Human Intravascular Delivery of AAV for Gene Transfer: AAV2-hFIX16 for Severe Hemophilia B.” *Molecular Therapy*, 28(9), 1–10.
- German, DC, Liang, CL, Song, T, Yazdani, U, ... Dietschy, JM. (2002). “Neurodegeneration in the Niemann-Pick C mouse: Glial involvement.” *Neuroscience*, 109(3), 437–450.
- Gómez-Grau, M, Albaigès, J, Casas, J, Auladell, C, ... Grinberg, D. (2017). “New murine Niemann-Pick type C models bearing a pseudoexon-generating mutation recapitulate the main neurobehavioural and molecular features of the disease.” *Scientific Reports*, 7, 1-16(41931).
- Griese, M, Brasch, F, Aldana, VR, Cabrera, MM, ... Lezana, FJ. (2010). “Respiratory disease in Niemann-Pick type C2 is caused by pulmonary alveolar proteinosis.” *Clinical Genetics*, 77(2), 119–130.
- Griffin, LD, Gong, W, Verot, L, & Mellon, SH. (2004). “Niemann-Pick type C disease involves disrupted neurosteroidogenesis and responds to allopregnanolone.” *Nature Medicine*, 10(7), 704–711.
- Grimm, D, Lee, JS, Wang, L, Desai, T, ... Kay, MA. (2008). “In Vitro and In Vivo Gene Therapy Vector Evolution via Multispecies Interbreeding and Retargeting of Adeno-Associated Viruses.” *Journal of Virology*, 82(12), 5887–5911.
- Guo, X, & Huang, L. (2012). “Recent advances in nonviral vectors for gene delivery.”

- Accounts of Chemical Research, 45(7), 971–979.
- Gurda, BL, Bagel, JH, Fisher, SJ, Schultz, ML, ... Swain, GP. (2018). "LC3 immunostaining in the inferior olivary nuclei of cats with Niemann-Pick disease type C1 is associated with patterned Purkinje cell loss." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 77(3), 229–245.
- Hardee, CL, Arévalo-Soliz, LM, Hornstein, BD, & Zechiedrich, L. (2017). "Advances in non-viral DNA vectors for gene therapy." *Genes*, 8(2).
- Haurigot, V, Marcó, S, Ribera, A, Garcia, M, ... Bosch, F. (2013). "Whole body correction of mucopolysaccharidosis IIIA by intracerebrospinal fluid gene therapy." *Journal of Clinical Investigation*, 123(8), 3254–3271.
- Hawes, CM, Wiemer, H, Krueger, SR, & Karten, B. (2010). "Pre-synaptic defects of NPC1-deficient hippocampal neurons are not directly related to plasma membrane cholesterol." *Journal of Neurochemistry*, 114(1), 311–322.
- Hegele, RA. (2009). "Plasma lipoproteins: Genetic influences and clinical implications." *Nature Reviews Genetics*, 10(2), 109–121.
- Heybrock, S, Kanerva, K, Meng, Y, Ing, C, ... Neculai, D. (2019). "Lysosomal integral membrane protein-2 (LIMP-2/SCARB2) is involved in lysosomal cholesterol export." *Nature Communications*, 10(1), 1-12(3521).
- Higashi, Y, Murayama, S, Pentchev, PG, & Suzuki, K. (1993). "Cerebellar degeneration in the Niemann-Pick type C mouse." *Acta Neuropathologica*, 85(2), 175–184.
- Hoggan, MD, Blacklow, NR, & Rowe, WP. (1966). "Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 55(6), 1467–1474.
- Hordeaux, J, Dubreil, L, Robveille, C, Deniaud, J, ... Colle, MA. (2017). "Long-term neurologic and cardiac correction by intrathecal gene therapy in Pompe disease." *Acta Neuropathologica Communications*, 5(66), 1–19.
- Hori, T, Ohashi, N, Chen, F, Baine, AMT, ... Nguyen, JH. (2012). "Simple and reproducible hepatectomy in the mouse using the clip technique." *World Journal of Gastroenterology*, 18(22), 2767–2774.
- Huang, SC, Everts, B, Ivanova, Y, Sullivan, DO, ... Pearce, ELEJ. (2014). "Cell-intrinsic lysosomal lipolysis is essential for alternative activation of macrophages." *Nature Immunology*, 15(9), 846–857.
- Hůlková, H, & Elleder, M. (2012). "Distinctive histopathological features that support a diagnosis of cholesterol ester storage disease in liver biopsy specimens." *Histopathology*, 60(7), 1107–1113.
- Ikonen, E. (2008). "Cellular cholesterol trafficking and compartmentalization." *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(2), 125–138.
- Iturriaga, C, Pineda, M, Fernández-Valero, EM, Vanier, MT, & Coll, MJ. (2006). "Niemann-Pick C disease in Spain: Clinical spectrum and development of a disability scale." *Journal of the Neurological Sciences*, 249, 1–6.
- Jahnova, H, Dvorakova, L, Vlaskova, H, Hulkova, H, ... Jesina, P. (2014). "Observational, retrospective study of a large cohort of patients with Niemann-Pick disease type C in the Czech Republic: a surprisingly stable diagnostic rate spanning almost 40 years." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(1), 1-16(140).

- James A. Bourne, & Marcello G.P. Rosa. (2006). "Hierarchical Development of the Primate Visual Cortex, as Revealed by Neurofilament Immunoreactivity: Early Maturation of the Middle Temporal Area (MT)." *Cerebral Cortex*, 16(3), 405–414.
- Jang, E, Kim, J-H, Lee, S, Kim, J-H, ... Suk, K. (2013). "Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes." *The Journal of Immunology*, 191(10), 5204–5219.
- Jiang, X, Sidhu, R, Porter, FD, Yanjanin, NM, ... Ory, DS. (2011). "A sensitive and specific LC-MS/MS method for rapid diagnosis of Niemann-Pick C1 disease from human plasma." *Journal of Lipid Research*, 52(7), 1435–1445.
- Jiang, X, Sidhu, R, Mydock-McGrane, L, Hsu, FF, ... Ory, DS. (2016). "Development of a bile acid-based newborn screen for Niemann-Pick disease type C." *Science Translational Medicine*, 8(337), 1-10(63).
- Karten, B, Campenot, RB, Vance, DE, & Vance, JE. (2006). "The Niemann-Pick C1 protein in recycling endosomes of presynaptic nerve terminals." *Journal of Lipid Research*, 47(3), 504–514.
- Kirchhoff, C, Osterhoff, C, & Young, L. (1996). "Molecular cloning and characterization of HE1, a major secretory protein of the human epididymis." *Biology of Reproduction*, 54(4), 847–856.
- Klochender, A, Weinberg-Corem, N, Moran, M, Swisa, A, ... Eden, A. (2012). "A Transgenic Mouse Marking Live Replicating Cells Reveals In Vivo Transcriptional Program of Proliferation." *Developmental Cell*, 23(4), 681–690.
- Klünemann, HH, Elleder, M, Kaminski, WE, Snow, K, ... Pendlebury, WW. (2002). "Frontal lobe atrophy due to a mutation in the cholesterol binding protein HE1/NPC2." *Annals of Neurology*, 52(6), 743–749.
- Ko, DC, Milenkovic, L, Beier, SM, Manuel, H, ... Scott, MP. (2005). "Cell-autonomous death of cerebellar purkinje neurons with autophagy in niemann-pick type C disease." *PLoS Genetics*, 1(1), 0081–0095.
- Koens, LH, Tijssen, MAJ, Lange, F, Wolffenbuttel, BHR, ... de Koning, TJ. (2018). "Eye movement disorders and neurological symptoms in late-onset inborn errors of metabolism." *Movement Disorders: Official Journal of the Movement Disorder Society*, 33(12), 1844–1856.
- Koukourakis, MI, Kalamida, D, Giatromanolaki, A, Zois, CE, ... Harris, AL. (2015). "Autophagosome proteins LC3A, LC3B and LC3C have distinct subcellular distribution kinetics and expression in cancer cell lines." *PLoS ONE*, 10(9), 1-13(e0137675).
- Kruth, HS, Comly, ME, Butler, JD, Vanier, MT, ... Pentchev, PG. (1986). "Type C Niemann-Pick disease. Abnormal metabolism of low density lipoprotein in homozygous and heterozygous fibroblasts." *Journal of Biological Chemistry*, 261(35), 16769–16774.
- Kuchar, L, Sikora, J, Gulinello, ME, Poupetova, H, ... Ledvinova, J. (2017). "Quantitation of plasmatic lysosphingomyelin and lysosphingomyelin-509 for differential screening of Niemann-Pick A/B and C diseases." *Analytical Biochemistry*, 525, 73–77.
- Kwon, HJ, Abi-Mosleh, L, Wang, ML, Deisenhofer, J, ... Infante, RE. (2009). "Structure of N-Terminal Domain of NPC1 Reveals Distinct Subdomains for Binding and Transfer of Cholesterol." *Cell*, 137(7), 1213–1224.

- Lane-Donovan, C, Philips, GT, & Herz, J. (2014). "More than Cholesterol Transporters: Lipoprotein Receptors in CNS Function and Neurodegeneration." *Neuron*, 83(4), 771–787.
- Lawrence, RE, & Zoncu, R. (2019). "The lysosome as a cellular centre for signalling, metabolism and quality control." *Nature Cell Biology*, 21(2), 133–142.
- Lentz, TB, Gray, SJ, & Samulski, RJ. (2012). "Viral vectors for gene delivery to the central nervous system." *Neurobiology of Disease*, 48(2), 179–188.
- Li, J, & Pfeffer, SR. (2016a). "Lysosomal membrane glycoproteins bind cholesterol and contribute to lysosomal cholesterol export." *ELife*, 5(9), 1-16(e21635).
- Li, X, Saha, P, Lib, J, Blobel, G, & Pfeffer, SR. (2016b). "Clues to the mechanism of cholesterol transfer from the structure of NPC1 middle lumenal domain bound to NPC2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(36), 10079–10084.
- Limphaibool, N, Iwanowski, P, Holstad, MJV, & Perkowska, K. (2018). "Parkinsonism in inherited metabolic disorders: Key considerations and major features." *Frontiers in Neurology*, 9, 1-10(857).
- Lisowski, L, Tay, SS, & Alexander, IE. (2015, August 22). "Adeno-associated virus serotypes for gene therapeutics." *Current Opinion in Pharmacology*. Elsevier Ltd.
- Liu, B, Turley, SD, Burns, DK, Miller, AM, ... Dietschy, JM. (2009). "Reversal of defective lysosomal transport in NPC disease ameliorates liver dysfunction and neurodegeneration in the npc1<sup>-/-</sup> mouse." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(7), 2377–2382.
- Lloyd-Evans, E, & Platt, FM. (2010). "Lipids on trial: The search for the offending metabolite in Niemann-Pick type C disease." *Traffic*, 11(4), 419–428.
- Lopez, ME, Klein, AD, Dimbil, UJ, & Scott, MP. (2011). "Anatomically defined neuron-based rescue of neurodegenerative niemann-pick type C disorder." *Journal of Neuroscience*, 31(12), 4367–4378.
- Lopez, ME, & Scott, MP. (2013). "Genetic dissection of a cell-autonomous neurodegenerative disorder: lessons learned from mouse models of Niemann-Pick disease type C." *Disease Models & Mechanisms*, 6(5), 1089–100.
- Lundstrom, K. (2018). "Viral vectors in gene therapy." *Diseases*, 6(42), 1–20.
- Luo, J, Jiang, L, Yang, H, & Song, BL. (2017). "Routes and mechanisms of post-endosomal cholesterol trafficking: A story that never ends." *Traffic*, 18(4), 209–217.
- Luo, J, Yang, H, & Song, BL. (2020). "Mechanisms and regulation of cholesterol homeostasis." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 21(4), 225–245.
- Luzio, JP, Hackmann, Y, Dieckmann, NMG, & Griffiths, GM. (2014). "The biogenesis of lysosomes and lysosome-related organelles." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(9), 1–17.
- Maass, F, Petersen, J, Hovakimyan, M, Schmitt, O, ... Wree, A. (2015). "Reduced cerebellar neurodegeneration after combined therapy with cyclodextrin/allopregnanolone and miglustat in NPC1: A mouse model of Niemann-Pick type C1 disease." *Journal of Neuroscience Research*, 93(3), 433–442.
- Madison, BB. (2016). "Srebp2: A master regulator of sterol and fatty acid synthesis." *Journal of Lipid Research*, 57(3), 333–335.



- Madra, M, & Sturley, SL. (2010, June). "Niemann-Pick type C pathogenesis and treatment: From statins to sugars." *Clinical Lipidology*. NIH Public Access.
- Makrypidi, G, Damme, M, Muller-Loennies, S, Trusch, M, ... Braulke, T. (2012). "Mannose 6 Dephosphorylation of Lysosomal Proteins Mediated by Acid Phosphatases Acp2 and Acp5." *Molecular and Cellular Biology*, 32(4), 774–782.
- Malik, BR, Maddison, DC, Smith, GA, & Peters, OM. (2019). "Autophagic and endo-lysosomal dysfunction in neurodegenerative disease." *Molecular Brain*, 12(100), 1–21.
- Marcó, S, Pujol, A, Roca, C, Motas, S, ... Bosch, F. (2016). "Progressive neurologic and somatic disease in a novel mouse model of human mucopolysaccharidosis type IIIC." *DMM Disease Models and Mechanisms*, 9(9), 999–1013.
- Marcó, S, Haurigot, V, & Bosch, F. (2019, October 1). "In Vivo Gene Therapy for Mucopolysaccharidosis Type III (Sanfilippo Syndrome): A New Treatment Horizon." *Human Gene Therapy*. Mary Ann Liebert Inc.
- Markmann, S, J. Christie-Reid, J, Rosenberg, JB, De, BP, ... Sondhi, D. (2018). "Attenuation of the Niemann-Pick type C2 disease phenotype by intracisternal administration of an AAVrh.10 vector expressing Npc2." *Experimental Neurology*, 306, 22–33.
- Marschalek, N, Albert, F, Meske, V, & Ohm, TG. (2014). "The natural history of cerebellar degeneration of Niemann-Pick C mice monitored in vitro." *Neuropathology and Applied Neurobiology*, 40(7), 933–945.
- Maue, RA, Burgess, RW, Wang, B, Wooley, CM, ... Erickson, RP. (2012). "A novel mouse model of Niemann-Pick type C disease carrying a D1005G-Npc1 mutation comparable to commonly observed human mutations." *Human Molecular Genetics*, 21(4), 730–750.
- Mccauliff, LA, Langan, A, Li, R, Ilnytska, O, ... Storch, J. (2019). "Intracellular cholesterol trafficking is dependent upon NPC2 interaction with Lysobisphosphatidic Acid." *ELife*, 8, (e50832).
- McCauliff, LA, Xu, Z, Li, R, Kodukula, S, ... Storch, J. (2015). "Multiple surface regions on the Niemann-pick C2 protein facilitate intracellular cholesterol transport." *Journal of Biological Chemistry*, 290(45), 27321–27331.
- Meng, Y, Heybrock, S, Neculai, D, & Saftig, P. (2020). "Cholesterol Handling in Lysosomes and Beyond." *Trends in Cell Biology*, 30(6), 452–466.
- Mengel, E, Klünemann, HH, Lourenço, CM, Hendriksz, CJ, ... Kolb, SA. (2013). "Niemann-Pick disease type C symptomatology: An expert-based clinical description." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 1–11.
- Millat, G, Chikh, K, Naureckiene, S, Sleat, DE, ... Vanier, MT. (2001). "Niemann-Pick Disease Type C: Spectrum of HE1 Mutations and Genotype/Phenotype Correlations in the NPC2 Group." *American Journal of Human Genetics*, 69(5), 1013–1021.
- Millat, G, Baillo, N, Molinero, S, Rodriguez, C, ... Vanier, MT. (2005). "Niemann-Pick C disease: Use of denaturing high performance liquid chromatography for the detection of NPC1 and NPC2 genetic variations and impact on management of patients and families." *Molecular Genetics and Metabolism*, 86(1–2), 220–232.
- Mingozzi, F, & High, KA. (2011). "Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: Progress and challenges." *Nature Reviews Genetics*, 12(5), 341–355.

- Mitsche, MA, McDonald, JG, Hobbs, HH, & Cohen, JC. (2015). "Flux analysis of cholesterol biosynthesis in vivo reveals multiple tissue and cell-type specific pathways." *ELife*, 4(6), 1-21(e07999).
- Motas, S, Haurigot, V, Garcia, M, Marcó, S, ... Bosch, F. (2016). "CNS-directed gene therapy for the treatment of neurologic and somatic mucopolysaccharidosis type II (Hunter syndrome)." *JCI Insight*, 1(9), 1–18.
- Munoz, T, & Raiman, JAJ. (2014). "Epilepsy and Niemann Pick C disease." *Journal of Pediatric Epilepsy*, 3(4), 229–234.
- Nagree, MS, Scalia, S, McKillop, WM, & Medin, JA. (2019). "An update on gene therapy for lysosomal storage disorders." *Expert Opinion on Biological Therapy*, 19(7), 655–670.
- Nakai, H, Montini, E, Fuess, S, Storm, TA, ... Kay, MA. (2003). "AAV serotype 2 vectors preferentially integrate into active genes in mice." *Nature Genetics*, 34(3), 297–302.
- Naldini, L. (2015). "Gene therapy returns to centre stage." *Nature*, 526(7573), 351–360.
- Naso, MF, Tomkowicz, B, Perry, WL, & Strohl, WR. (2017). "Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy." *BioDrugs*, 31(4), 317–334.
- Naureckiene, S, Sleat, DE, Lackland, H, Fensom, A, ... Lobel, P. (2000). "Identification of HE1 as the second gene of Niemann-Pick C disease." *Science*, 290(5500), 2298–301.
- Nave, KA, & Werner, HB. (2014). "Myelination of the nervous system: mechanisms and functions." *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 30, 503–533.
- Nes, WD. (2011). "Biosynthesis of cholesterol and other sterols." *Chemical Reviews*, 111(10), 6423–6451.
- Neßlauer, AM, Gläser, A, Gräler, M, Engelmann, R, ... Bräuer, AU. (2019). "A therapy with miglustat, 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin and allopregnanolone restores splenic cholesterol homeostasis in Niemann-pick disease type C1." *Lipids in Health and Disease*, 18(1).
- Newton, J, Milstien, S, & Spiegel, S. (2018). "Niemann-Pick type C disease: The atypical sphingolipidosis." *Advances in Biological Regulation*, 70, 82–88.
- Nia, S. (2014). "Psychiatric signs and symptoms in treatable inborn errors of metabolism." *Journal of Neurology*, 261(S2), 559–568.
- Olaleye, MT, & Rocha, BTJ. (2008). "Acetaminophen-induced liver damage in mice: Effects of some medicinal plants on the oxidative defense system." *Experimental and Toxicologic Pathology*, 59(5), 319–327.
- Orth, M, & Bellosta, S. (2012). "Cholesterol: Its Regulation and Role in Central Nervous System Disorders." *Cholesterol*, 2012, 1–19.
- Ory, DS, Ottinger, EA, Farhat, NY, King, KA, ... Porter, FD. (2017). "Intrathecal 2-hydroxypropyl- $\beta$ -cyclodextrin decreases neurological disease progression in Niemann-Pick disease, type C1: a non-randomised, open-label, phase 1–2 trial." *The Lancet*, 390(10104), 1758–1768.
- Pacheco, CD, & Lieberman, AP. (2008). "The pathogenesis of Niemann-Pick type C disease: A role for autophagy?" *Expert Reviews in Molecular Medicine*, 10(26), 1–14.
- Paladio, N. (2010). "Miglustat (ZAVESCA) per al tractament de la malaltia de Niemann-

- Pick C." *Annals de Medicina*, 93(2), 75–79.
- Palmeri, S, Battisti, C, Federico, A, & Guazzi, GC. (1994). "Hypoplasia of the corpus callosum in Niemann-Pick type C disease." *Neuroradiology*, 36(1), 20–2.
- Palpagama, TH, Waldvogel, HJ, Faull, RLM, & Kwakowsky, A. (2019). "The Role of Microglia and Astrocytes in Huntington's Disease." *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 12, 1-15(258).
- Parenti, G, Andria, G, & Ballabio, A. (2015). "Lysosomal Storage Diseases: From Pathophysiology to Therapy." *Annual Review of Medicine*, 66(1), 471–486.
- Park, WD, O'Brien, JF, Lundquist, PA, Kraft, DL, ... Snow, K. (2003). "Identification of 58 novel mutations in Niemann-Pick disease type C: Correlation with biochemical phenotype and importance of PTC1-like domains in NPC1." *Human Mutation*, 22(4), 313–325.
- Patel, M, Oza, N, Anand, I, Deshpande, S, & Patel, C. (2008). "Liver X receptor: A novel therapeutic target." *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 70(2), 135–144.
- Patterson, MC, Di Bisceglie, AM, Higgins, JJ, Abel, RB, ... Barton, NW. (1993). "The effect of cholesterol-lowering agents on hepatic and plasma cholesterol in Niemann-Pick disease type C." *Neurology*, 43(1), 61–64.
- Patterson, MC, Mengel, E, Wijburg, FA, Muller, A, ... Pineda, M. (2013). "Disease and patient characteristics in NP-C patients: findings from an international disease registry." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 8(1), 1–10.
- Patterson, MC, Mengel, E, Vanier, MT, Moneuse, P, ... Pineda, M. (2020). "Treatment outcomes following continuous miglustat therapy in patients with Niemann-Pick disease Type C: A final report of the NPC Registry." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 15(104), 1–10.
- Patterson, MC, Hendriksz, CJ, Walterfang, M, Sedel, F, ... Wijburg, F. (2012). "Recommendations for the diagnosis and management of Niemann-Pick disease type C: An update." *Molecular Genetics and Metabolism*, 106(3), 330–344.
- Pentchev, PG, Boothe, AD, & Kurth, HS. (1984). "A genetic storage disorder in BALB/C mice with a metabolic block in esterification of exogenous cholesterol." *Journal of Biological Chemistry*, 259(9), 5784–5791.
- Perez, BA, Shutterly, A, Chan, YK, Byrne, BJ, & Corti, M. (2020). "Management of neuroinflammatory responses to AAV-mediated gene therapies for neurodegenerative diseases." *Brain Sciences*, 10(2), 1–16.
- Petrov, AM, Kasimov, MR, & Zefirov, AL. (2016). "Brain cholesterol metabolism and its defects: Linkage to neurodegenerative diseases and synaptic dysfunction." *Acta Naturae*, 8(1), 58–73.
- Pettazzoni, M, Froissart, R, Pagan, C, Vanier, MT, ... Cheillan, D. (2017). "LC-MS/MS multiplex analysis of lysosphingolipids in plasma and amniotic fluid: A novel tool for the screening of sphingolipidoses and Niemann-Pick type C disease." *PLoS ONE*, 12(7), 1–19.
- Piguet, F, Alves, S, & Cartier, N. (2017). "Clinical Gene Therapy for Neurodegenerative Diseases: Past, Present, and Future." *Human Gene Therapy*, 28(11), 988–1003.
- Pineda, M, Juričková, K, Karimzadeh, P, Kolnikova, M, ... Kolb, SA. (2019). "Disease characteristics, prognosis and miglustat treatment effects on disease progression in patients with Niemann-Pick disease Type C: An international, multicenter,

- retrospective chart review." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 1–10.
- Pineda, M, Walterfang, M, & Patterson, MC. (2018). "Miglustat in Niemann-Pick disease type C patients: A review." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 13(1).
- Platt, FM, Neises, GR, Dwek, RA, & Butters, TD. (1994). "N-butyldeoxynojirimycin is a novel inhibitor of glycolipid biosynthesis." *Journal of Biological Chemistry*, 269(11), 8362–8365.
- Platt, FM, & Lachmann, RH. (2009). "Treating lysosomal storage disorders: Current practice and future prospects." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), 737–745.
- Platt, FM, Wassif, C, Colaco, A, Dardis, A, ... Porter, FD. (2014). "Disorders of cholesterol metabolism and their unanticipated convergent mechanisms of disease." *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 15, 173–194.
- Platt, FM, D'Azzo, A, Davidson, BL, Neufeld, EF, & Tiffit, CJ. (2018). "Lysosomal storage diseases." *Nature Reviews Disease Primers*, 4(1), 1–25.
- Platt, N, Speak, AO, Colaco, A, Gray, J, ... Platt, FM. (2016). "Immune dysfunction in Niemann-Pick disease type C." *Journal of Neurochemistry*, 136, 74–80.
- Porter, FD, Scherrer, DE, Lanier, MH, Langmade, SJ, ... Ory, DS. (2010). "Cholesterol oxidation products are sensitive and specific blood-based biomarkers for Niemann-Pick C1 disease." *Science Translational Medicine*, 2(56), 1-12(56ra81).
- Powell, SK, Samulski, RJ, & McCown, TJ. (2020). "AAV Capsid-Promoter Interactions Determine CNS Cell-Selective Gene Expression In Vivo." *Molecular Therapy*, 28(5), 1373–1380.
- Puri, V, Watanabe, R, Dominguez, M, Sun, X, ... Pagano, RE. (1999). "Cholesterol modulates membrane traffic along the endocytic pathway in sphingolipid-storage diseases." *Nature Cell Biology*, 1(6), 386–388.
- Rabenstein, M, Murr, N, Hermann, A, Rolfs, A, & Frech, MJ. (2019). "Alteration of GABAergic Input Precedes Neurodegeneration of Cerebellar Purkinje Cells of NPC1-Deficient Mice." *International Journal of Molecular Sciences*, 20(24), 1-12(6288).
- Rabinowitz, JE, Rolling, F, Li, C, Conrath, H, ... Samulski, RJ. (2002). "Cross-Packaging of a Single Adeno-Associated Virus (AAV) Type 2 Vector Genome into Multiple AAV Serotypes Enables Transduction with Broad Specificity." *Journal of Virology*, 76(2), 791–801.
- Rangarathnam, B, Kamarunas, E, & McCullough, GH. (2014). "Role of Cerebellum in Deglutition and Deglutition Disorders." *Cerebellum*, 13(6), 767–776.
- Reid, PC, Lin, S, Vanier, MT, Ohno-Iwashita, Y, ... Chang, TY. (2008). "Partial blockage of sterol biosynthesis with a squalene synthase inhibitor in early postnatal Niemann-Pick type C npc1h null mice brains reduces neuronal cholesterol accumulation, abrogates astrogliosis, but may inhibit myelin maturation." *Journal of Neuroscience Methods*, 168(1), 15–25.
- Reunert, J, Lotz-Havla, AS, Polo, G, Kannenberg, F, ... Marquardt, T. (2015). "Niemann-pick type C-2 disease: Identification by analysis of plasma cholestane-3 $\beta$ ,5 $\alpha$ ,6 $\beta$ -triol and further insight into the clinical phenotype." *JIMD Reports*, 23, 17–26.
- Ribera, A, Garcia, M, Marcó, S, Motas, S, ... Añor, S. (2015). "Biochemical, histological and functional correction of mucopolysaccharidosis type IIIB by intra-cerebrospinal

- fluid gene therapy." *Human Molecular Genetics*, 24(7), 2078–2095.
- Riederer, MA, Soldati, T, Shapiro, AD, Lin, J, & Pfeffer, SR. (1994). "Lysosome biogenesis requires rab9 function and receptor recycling from endosomes to the trans-Golgi network." *Journal of Cell Biology*, 125(3), 573–582.
- Roca, C, Motas, S, Marcó, S, Ribera, A, ... Bosch, F. (2017). "Disease correction by AAV-mediated gene therapy in a new mouse model of mucopolysaccharidosis type IIID." *Human Molecular Genetics*, 26(8), 1535–1551.
- Rodriguez-Gil, JL, Watkins-Chow, DE, Baxter, LL, Yokoyama, T, ... Pavan, WJ. (2019). "NPC1 Deficiency in Mice is Associated with Fetal Growth Restriction, Neonatal Lethality and Abnormal Lung Pathology." *Journal of Clinical Medicine*, 9(1), 1–13.
- Roszell, BR, Tao, J-QJ-Q, Yu, KJ, Gao, L, ... Bates, SR. (2013). "Pulmonary Abnormalities in Animal Models Due to Niemann-Pick Type C1 (NPC1) or C2 (NPC2) Disease." *PLoS ONE*, 8(7), 1-14(e67084).
- Rowan, DJ, Tomatsu, S, Grubb, JH, Montañó, AM, & Sly, WS. (2013). "Assessment of bone dysplasia by micro-CT and glycosaminoglycan levels in mouse models for mucopolysaccharidosis type I, IIIA, IVA, and VII." *Journal of Inherited Metabolic Disease*, 36(2), 235–246.
- Runz, H, Dolle, D, Schlitter, AM, & Zschocke, J. (2008). "NPC-db, a Niemann-Pick type C disease gene variation database." *Human Mutation*, 29(3), 345–350.
- Ruzo, A, Marcó, S, García, M, Villacampa, P, ... Bosch, F. (2012a). "Correction of pathological accumulation of glycosaminoglycans in central nervous system and peripheral tissues of MPSIIIA mice through systemic AAV9 gene transfer." *Human Gene Therapy*, 23(12), 1237–1246.
- Ruzo, A, Garcia, M, Ribera, A, Villacampa, P, ... Ruberte, J. (2012b). "Liver production of sulfamidase reverses peripheral and ameliorates CNS pathology in mucopolysaccharidosis IIIA mice." *Molecular Therapy : The Journal of the American Society of Gene Therapy*, 20(2), 254–266.
- Saftig, P, & Klumperman, J. (2009). "Lysosome biogenesis and lysosomal membrane proteins: Trafficking meets function." *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(9), 623–635.
- Saher, G, Rudolphi, F, Corthals, K, Ruhwedel, T, ... Nave, K-AA. (2012). "Therapy of Pelizaeus-Merzbacher disease in mice by feeding a cholesterol-enriched diet." *Nature Medicine*, 18(7), 1130–1135.
- Saher, G, & Stumpf, SK. (2015). "Cholesterol in myelin biogenesis and hypomyelinating disorders ☆." *BBA - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1851, 1083–1094.
- Samaranch, L, Pérez-Cañamás, A, Soto-Huelin, B, Sudhakar, V, ... Ledesma, MD. (2019). "Adeno-associated viral vector serotype 9-based gene therapy for Niemann-Pick disease type A." *Science Translational Medicine*, 11(506), 1–15.
- Samulski, RJ, & Muzyczka, N. (2014). "AAV-Mediated Gene Therapy for Research and Therapeutic Purposes." *Annual Review of Virology*, 1(1), 427–451.
- Sardiello, M, Palmieri, M, di Ronza, A, Medina, DL, ... Ballabio, A. (2009). "A gene network regulating lysosomal biogenesis and function." *Science (New York, N.Y.)*, 325(5939), 473–477.
- Sarna, JR, & Hawkes, R. (2003). "Patterned Purkinje cell death in the cerebellum." *Progress in Neurobiology*, 70(6), 473–507.

- Seranova, E, Connolly, KJ, Zatyka, M, Rosenstock, TR, ... Sarkar, S. (2017). "Dysregulation of autophagy as a common mechanism in lysosomal storage diseases." *Essays in Biochemistry*, 61(6), 733–749.
- Sévin, M, Lesca, G, Baumann, N, Millat, G, ... Sedel, F. (2007). "The adult form of Niemann-Pick disease type C." *Brain*, 130(1), 120–133.
- Shafique, S, & Rayi, A. (2020). "Anatomy, Head and Neck, Subarachnoid Space." In *StatPearls* [Internet]. StatPearls Publishing.
- Sharpe, LJ, & Brown, AJ. (2013). "Controlling cholesterol synthesis beyond 3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase (HMGCR)." *Journal of Biological Chemistry*, 288(26), 18707–18715.
- Shen, D, Wang, X, Li, X, Zhang, X, ... Xu, H. (2012). "Lipid storage disorders block lysosomal trafficking by inhibiting a TRP channel and lysosomal calcium release." *Nature Communications*, 3(731), 1–11.
- Sheth, J, Joseph, JJ, Shah, K, Muranjan, M, ... Sheth, F. (2017). "Pulmonary manifestations in Niemann-Pick type C disease with mutations in NPC2 gene: case report and review of literature." *BMC Medical Genetics*, 18(5), 1–5.
- Shi, XZ, Zhong, X, & Yu, XQ. (2012). "Drosophila melanogaster NPC2 proteins bind bacterial cell wall components and may function in immune signal pathways." *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 42(8), 545–556.
- Simons, M, & Nave, KA. (2016). "Oligodendrocytes: Myelination and axonal support." *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 8(1).
- Simons, M, Krämer, EM, Macchi, P, Rathke-Hartlieb, S, ... Schulz, JB. (2002). "Overexpression of the myelin proteolipid protein leads to accumulation of cholesterol and proteolipid protein in endosomes/lysosomes: Implications for Pelizaeus-Merzbacher disease." *Journal of Cell Biology*, 157(2), 327–336.
- Sitarska, D, & Ługowska, A. (2019). "Laboratory diagnosis of the Niemann-Pick type C disease: an inherited neurodegenerative disorder of cholesterol metabolism." *Metabolic Brain Disease*, 34(5), 1253–1260.
- Sleat, DE, Wiseman, JA, El-Banna, M, Price, SM, ... Lobel, P. (2004). "Genetic evidence for nonredundant functional cooperativity between NPC1 and NPC2 in lipid transport." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(16), 5886–5891.
- Soccio, RE, & Breslow, JL. (2004). "Intracellular cholesterol transport." *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 24(7), 1150–1160.
- Steinberg, SJ, Ward, CP, & Fensom, AH. (1994). "Complementation studies in Niemann-Pick disease type C indicate the existence of a second group." *Journal of Medical Genetics*, 31(4), 317–320.
- Storch, J, & Xu, Z. (2009). "Niemann-Pick C2 (NPC2) and intracellular cholesterol trafficking." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1791(7), 671–678.
- Takikita, S, Fukuda, T, Mohri, I, Yagi, T, & Suzuki, K. (2004). "Perturbed myelination process of premyelinating oligodendrocyte in Niemann-Pick type C mouse." *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 63(6), 660–673.
- Tiscione, SA, Vivas, O, Ginsburg, KS, Bers, DM, ... Dickson, EJ. (2019). "Disease-associated mutations in Niemann-Pick type C1 alter ER calcium signaling and

- neuronal plasticity." *Journal of Cell Biology*, 218(12), 4141–4156.
- Torres, S, Balboa, E, Zanlungo, S, Enrich, C, ... Fernandez-Checa, JC. (2017). "Lysosomal and mitochondrial liaisons in Niemann-Pick disease." *Frontiers in Physiology*, 8, 1-13(982).
- Totenhagen, JW, Lope-Piedrafita, S, Borbon, IA, Yoshimaru, ES, ... Trouard, TP. (2012). "In vivo assessment of neurodegeneration in niemann-pick type C mice by quantitative T2 mapping and diffusion tensor imaging." *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, 35(3), 528–536.
- Vanier, MT. (1983). "Biochemical studies in niemann-pick disease I. Major sphingolipids of liver and spleen." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 750(1), 178–184.
- Vanier, MT. (1999). "Lipid changes in Niemann-Pick disease type C brain: Personal experience and review of the literature." *Neurochemical Research*, 24(4), 481–489.
- Vanier, MT. (2010). "Niemann-Pick disease type C." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 5(16), 1–18.
- Vanier, MT, & Latour, P. (2015). "Laboratory diagnosis of Niemann-Pick disease type C: The filipin staining test." In *Lysosomes and Lysosomal Diseases* (Vol. 126, pp. 357–375).
- Vanier, MT, & Millat, G. (2003). "Niemann-Pick disease type C." *Clinical Genetics*, 64, 269–281.
- Vázquez, MC, Balboa, E, Alvarez, AR, & Zanlungo, S. (2012). "Oxidative Stress: A Pathogenic Mechanism for Niemann-Pick Type C Disease." *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012, 1–11.
- Verdera, HC, Kuranda, K, & Mingozzi, F. (2020). "AAV Vector Immunogenicity in Humans: A Long Journey to Successful Gene Transfer." *Molecular Therapy*, 28(3), 723–746.
- Verot, L, Chikh, K, Freydière, E, Honoré, R, ... Millat, G. (2007). "Niemann-Pick C disease: Functional characterization of three NPC2 mutations and clinical and molecular update on patients with NPC2." *Clinical Genetics*, 71(4), 320–330.
- Walkley, SU, & Suzuki, K. (2004). "Consequences of NPC1 and NPC2 loss of function in mammalian neurons." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1685(1–3), 48–62.
- Walkley, SU, & Vanier, MT. (2009). "Pathomechanisms in Lysosomal Storage Disorders." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research*, 1793(4), 726–736.
- Walterfang, M, Chien, YH, Imrie, J, Rushton, D, ... Patterson, MC. (2012). "Dysphagia as a risk factor for mortality in Niemann-Pick disease type C: Systematic literature review and evidence from studies with miglustat." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 7(76), 1–17.
- Wang, D, Tai, PWL, & Gao, G. (2019). "Adeno-associated virus vector as a platform for gene therapy delivery." *Nature Reviews Drug Discovery*, 18(5), 358–378.
- Wang, ML, Motamed, M, Infante, RE, Abi-Mosleh, L, ... Goldstein, JL. (2010). "Identification of surface residues on Niemann-Pick C2 essential for hydrophobic handoff of cholesterol to NPC1 in lysosomes." *Cell Metabolism*, 12(2), 166–173.
- Ward, S, O'Donnell, P, Fernandez, S, & Vite, CH. (2010). "2-Hydroxypropyl-β-

- cyclodextrin raises hearing threshold in normal cats and in cats with niemann-pick type C disease." *Pediatric Research*, 68(1), 52–56.
- Wassif, CA, Cross, JL, Iben, J, Sanchez-Pulido, L, ... Porter, FD. (2016). "High incidence of unrecognized visceral/neurological late-onset Niemann-Pick disease, type C1, predicted by analysis of massively parallel sequencing data sets." *Genetics in Medicine*, 18(1), 41–48.
- Welford, RWD, Garzotti, M, Lourenço, CM, Mengel, E, ... Groenen, P. (2014). "Plasma lysosphingomyelin demonstrates great potential as a diagnostic biomarker for niemann-pick disease type C in a retrospective study." *PLoS ONE*, 9(12), 1-17(e114669).
- Werner, HB, Krämer-Albers, EM, Strenzke, N, Saher, G, ... Nave, KA. (2013). "A critical role for the cholesterol-associated proteolipids PLP and M6B in myelination of the central nervous system." *GLIA*, 61(4), 567–586.
- Wilcox, WR. (2004). "Lysosomal storage disorders: The need for better pediatric recognition and comprehensive care." *Journal of Pediatrics*, 144(S5), 3–14.
- Williamson, JM, & Lyons, DA. (2018). "Myelin dynamics throughout life: An ever-changing landscape?" *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 12, 1-8(424).
- Wright, BLC, Lai, JTF, & Sinclair, AJ. (2012). "Cerebrospinal fluid and lumbar puncture: A practical review." *Journal of Neurology*, 259(8), 1530–1545.
- Xie, X, Brown, MS, Shelton, JM, Richardson, JA, ... Liang, G. (2011). "Amino acid substitution in NPC1 that abolishes cholesterol binding reproduces phenotype of complete NPC1 deficiency in mice." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(37), 15330–15335.
- Xu, S, Zhou, S, Xia, D, Xia, J, ... Luo, J. (2010). "Defects of synaptic vesicle turnover at excitatory and inhibitory synapses in Niemann-Pick C1-deficient neurons." *Neuroscience*, 167(3), 608–620.
- Xu, S, Benoff, B, Liou, H-L, Lobel, P, & Stock, AM. (2007). "Structural basis of sterol binding by NPC2, a lysosomal protein deficient in niemann-pick type C2 disease." *The Journal of Biological Chemistry*, 282(32), 23525–23531.
- Xu, Y, Zhang, Q, Tan, L, Xie, X, & Zhao, Y. (2019). "The characteristics and biological significance of NPC2: Mutation and disease." *Mutation Research - Reviews in Mutation Research*, 782, 1–6.
- Xu, Z, Farver, W, Kodukula, S, & Storch, J. (2008). "Regulation of Sterol Transport between Membranes and NPC2." *Biochemistry*, 47, 11134–11143.
- Yaman, A, Eminoğlu, FT, Kendirli, T, Ödek, Ç, ... Deda, G. (2015). "A rare cause of fatal pulmonary alveolar proteinosis: Niemann-Pick disease type C2 and a novel mutation." *Journal of Pediatric Endocrinology and Metabolism*, 28(9–10), 1163–1167.
- Yang, F, Feng, X, Rolfs, A, & Luo, J. (2018). "Lovastatin promotes myelin formation in NPC1 mutant oligodendrocytes." *Journal of the Neurological Sciences*, 386(September 2017), 56–63.
- Yang, YS, Xie, J, Wang, D, Kim, JM, ... Shim, JH. (2019). "Bone-targeting AAV-mediated silencing of Schnurri-3 prevents bone loss in osteoporosis." *Nature Communications*, 10(1), 1–13.
- Yu, T, Shakkottai, VG, Chung, C, & Lieberman, AP. (2011). "Temporal and cell-specific



- deletion establishes that neuronal Npc1 deficiency is sufficient to mediate neurodegeneration." *Human Molecular Genetics*, 20(22), 4440–4451.
- Yu, T, & Lieberman, AP. (2013). "Npc1 Acting in Neurons and Glia Is Essential for the Formation and Maintenance of CNS Myelin." *PLoS Genetics*, 9(4), e1003462.
- Zampieri, S, Bianchi, E, Cantile, C, Saleri, R, ... Dardis, A. (2014). "Characterization of a Spontaneous Novel Mutation in the NPC2 Gene in a Cat Affected by Niemann Pick Type C Disease." *PLoS ONE*, 9(11), e112503.
- Zervas, M, Somers, KL, Thrall, MA, & Walkley, SU. (2001a). "Critical role for glycosphingolipids in Niemann-Pick disease type C." *Current Biology : CB*, 11(16), 1283–7.
- Zervas, M, Dobrenis, K, & Walkley, SU. (2001b). "Neurons in Niemann-Pick Disease Type C Accumulate Gangliosides as Well as Unesterified Cholesterol and Undergo Dendritic and Axonal Alterations." *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, 60(1), 49–64.
- Zhang, H, Wang, Y, Lin, N, Yang, R, ... Gu, X. (2014). "Diagnosis of Niemann-Pick disease type C with 7-ketocholesterol screening followed by NPC1/NPC2 gene mutation confirmation in Chinese patients." *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 9(1), 1–10.
- Zhang, J, & Liu, Q. (2015). "Cholesterol metabolism and homeostasis in the brain." *Protein and Cell*, 6(4), 254–264.
- Zhang, J, Dudley-Rucker, N, Crowley, JR, Lopez-Perez, E, ... Ory, DS. (2004). "The steroidal analog GW707 activates the SREBP pathway through disruption of intracellular cholesterol trafficking." *Journal of Lipid Research*, 45(2), 223–31.
- Zhou, S, Davidson, C, McGlynn, R, Stephney, G, ... Walkley, SU. (2011). "Endosomal/lysosomal processing of gangliosides affects neuronal cholesterol sequestration in Niemann-pick disease type C." *American Journal of Pathology*, 179(2), 890–902.
- Zincarelli, C, Soltys, S, Rengo, G, & Rabinowitz, JE. (2008). "Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection." *Molecular Therapy*, 16(6), 1073–1080.

