

TÍTULO

Una aproximación multifactorial para avanzar en el estudio de las terapias para enfermedades mitocondriales neurodegenerativas, utilizando COXPD1 como modelo.

EQUIPO INVESTIGADOR

Grupos de investigación liderados por los investigadores principales que se indican a continuación:

- Ramon Martí Seves**. Vall d'Hebron Insitut de Recerca (VHIR), Barcelona
- Antonio Zorzano Olarte**. Institut de Recerca Biomèdica (IRB), Barcelona
- Gloria González Aseguinolaza**. CIMA-Universidad de Navarra, Pamplona
- Alejandra Darling**. Hospital Sant Joan de Déu (HSJD), Esplugues de Llobregat, Barcelona.

DURACIÓN PREVISTA

Tres años

INTRODUCCIÓN

La hepatoencefalopatía debida a la deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa tipo 1 (COXPD1, OMMIN#609060) es una enfermedad mitocondrial debida a mutaciones en el gen nuclear *GFM1* que codifica el factor de elongación mitocondrial G1 (EFG1). La COXPD1 se manifiesta desde edad muy temprana con hipo e hipertonia muscular, retraso del desarrollo, convulsiones, polineuropatía, microcefalia y rasgos dismórficos menores. Los rasgos neuroradiológicos más comunes incluyen estrechamiento del cuerpo caloso, leucodistrofia y afectación del ganglio basal. Es una enfermedad infantil ultrarara que cuenta con menos de 40 casos descritos en la literatura¹⁻¹⁵, además de tres casos adicionales recientemente descritos en España y aun no publicados (comunicación personal).

La enfermedad progresa rápidamente y la mayoría de los pacientes mueren durante los primeros meses de vida, aunque existen algunos casos que presentan una mayor supervivencia¹⁻¹⁰. Debido al escaso número de pacientes es difícil establecer una correlación entre las diferentes mutaciones en el gen *GFM1* con la severidad del cuadro clínico y su pronóstico. Sin embargo, se ha observado que algunos de los pacientes con mayor esperanza de vida presentan la mutación c.2011C>T, que causa el cambio de aminoácido p.R671C^{2-4, 6}.

Hasta hace poco el modelo de estudio de la enfermedad más utilizado eran los fibroblastos obtenidos de pacientes. El uso de este modelo ha resultado muy útil para el diagnóstico y caracterización fisiopatológica de la enfermedad COXPD1. Por otra parte, los fibroblastos de pacientes han permitido llevar a cabo rastreos farmacológicos para identificar pequeñas moléculas con potencial terapéutico¹⁶. No obstante, este tipo de aproximaciones, que son útiles para hacer screening de compuestos de alto rendimiento, deben ser complementadas con el testado en modelos animales de la enfermedad de las moléculas que demuestran resultados positivos en células cultivadas de pacientes, para identificar aquellas más prometedoras en base a su eficacia y farmacología.

Una de nuestras líneas prioritarias de investigación se ha centrado en los últimos años en el desarrollo de un modelo de ratón de COXPD1. Para ello, hemos generado un ratón *knock-in* (KI) *Gfm1*^{R671C} portador de la mutación puntual en el gen *Gfm1* que produce el cambio de aminoácidos en EFG1 que más frecuentemente se ha encontrado en pacientes de COXPD1 y asociado con mayor supervivencia. La caracterización del modelo ha mostrado que la mutación da lugar a una reducción drástica en la expresión de la proteína EFG1 (reducción del 85 % en hígado, 65 % en cerebro, 81 % en riñón y 88 % en corazón, en mitocondrias de ratones homocigotos para la mutación) sin que los niveles del ARN mensajero se vean alterados. Estos animales presentan además una reducción de la tasa de traducción mitocondrial en hígado y un descenso de la actividad del complejo CIV en el mismo tejido¹⁷.

Nuestros intentos por obtener ratones homocigotos *knock-out* (KO) en el gen *Gfm1* revelaron que la ausencia del gen en homocigosis es letal en estado embrionario, de manera que sólo pudimos obtener ratones heterocigotos para el alelo KO. Todo ello demuestra la importancia de esta proteína para el desarrollo del ratón, y revela que pequeñas cantidades residuales de la proteína con esta mutación pueden evitar esta letalidad. Partiendo de estas observaciones, hemos generado un ratón heterocigoto compuesto *Gfm1*^{R671/KO} (ratones KI/KO). Estos ratones son viables, pero presentan una mayor reducción de la cantidad de proteína EFG1 en mitocondrias de hígado que el modelo KI, lo que ocasiona una disminución de la tasa de traducción mitocondrial y un mayor déficit de la actividad de los complejos I y IV en hígado. Además, este modelo también ha mostrado un déficit de la actividad de los complejos I y IV en cerebro, lo que demuestra que es un mejor modelo para el estudio de la enfermedad que el homocigoto KI¹⁷.

Este modelo animal único de COXPD1 nos va a permitir testar la eficacia de compuestos que muestren efectos positivos en screening sobre células derivadas de pacientes. La obtención de resultados positivos *in vivo* facilitaría la introducción de estos potenciales tratamientos farmacológicos a la fase clínica.

Por otra parte, la naturaleza monogénica de la COXPD1 hace que esta enfermedad sea una buena candidata para ser abordada mediante terapia génica. Durante las últimas décadas se ha desarrollado un número importante de terapias basadas en la transferencia de genes o terapia génica para enfermedades de origen genético, en su mayoría enfermedades minoritarias¹⁸. Son numerosos los estudios preclínicos que demuestran un claro beneficio de la terapia génica para diversas enfermedades congénitas, además de otras enfermedades como algunos tipos de cáncer e infecciones virales crónicas. Más importante es el hecho de que algunos de estos estudios han sido transferidos a la práctica clínica demostrando la eficacia y seguridad de la terapia génica¹⁸.

En cuanto a las estrategias empleadas, los vectores lentivirales (LV) han sido utilizados de forma exitosa en terapias génicas *ex vivo* mediante la corrección de las células madre hematopoyéticas para algunas enfermedades como la adrenoleucodistrofia ligada al cromosoma X¹⁹, la leucodistrofia metacromática²⁰, el síndrome de Wiskott-Aldrich²¹, la beta-talasemia²² y la anemia de Fanconi²³, entre otras. Puesto que los LVs se integran en el genoma, facilitan una corrección genética permanente que permita la expansión de las células corregidas en cultivo para la posterior reinfusión. Sin embargo, la naturaleza integrativa de los LVs también puede ser un inconveniente debido a su potencial genotoxicidad, ya que la integración lentiviral se produce de forma aleatoria y pueden dar lugar a mutación insercional. Por este motivo, el uso de vectores no integrativos, como los vectores basados en los virus adenoasociados (AAVs) son actualmente la opción preferida para las estrategias de terapia génica *in vivo*. Los AAVs se han convertido en los vectores de transferencia líderes en el desarrollo clínico debido a su biología, estructura simple y ausencia de enfermedades asociadas conocidas. Además, un gran número de ensayos clínicos han demostrado que son seguros y bien tolerados²⁴. El uso de los AAVs puede ofrecer la corrección génica de un tejido específico tras su administración sistémica. Gracias a la combinación de diferentes cápsides víricas con un tropismo determinado, junto con la regulación de la expresión génica mediante promotores específicos, se puede dirigir la terapia a los órganos afectados²⁵⁻²⁷.

Nuestra propuesta en este proyecto se basa en la introducción de la versión correcta del gen *GFM1* en las células del cerebro y del hígado de los pacientes, utilizando un vector AAV. La disponibilidad del modelo murino¹⁷ nos ha resultado de suma utilidad para abordar este objetivo, ya que nuestros primeros resultados experimentales han demostrado que la introducción del gen humano *GFM1* en el hígado del ratón mediante un vector AAV9 con promotor hepático restituye la expresión de la proteína EFG1 y su correcta traslocación mitocondrial. Pero lo más importante es que esta proteína restituida es funcional, ya que los ratones tratados recuperan la expresión de las subunidades de la cadena respiratoria codificadas por el mtDNA y la actividad de sus complejos I y IV (Molina-Berenguer, Martí et al, resultados preliminares no publicados). Todo ello ha sido observado en hígado, y uno de los objetivos de este proyecto es ampliarlo al cerebro, que es el otro órgano gravemente afectado en esta enfermedad.

OBJETIVOS

El principal objetivo de esta propuesta es identificar terapias eficaces para el tratamiento de la hepatoencefalopatía debida a la deficiencia combinada de la fosforilación oxidativa tipo 1 (COXPD1). Este objetivo general se perseguirá mediante el desarrollo de actividades que den lugar a los siguientes objetivos concretos:

1-Usaremos fibroblastos cultivados de pacientes con COXPD1 para realizar un cribado con una biblioteca de 48.000 compuestos. El compuesto que muestre las propiedades más beneficiosas en células humanas se probará in vivo usando un modelo de ratón *Gfm1*^{R671C/KO} que ya hemos generado y caracterizado.

2-Estudiaremos el efecto de la aplicación de la terapia génica en este modelo murino, utilizando un AAV con un serotipo sintético que ha demostrado atravesar la barrera hematoencefálica y llegar al sistema nervioso central²⁸.

3-Identificaremos marcadores bioquímicos que puedan resultar útiles para monitorizar la progresión de la enfermedad, y que por tanto resulten útiles como biomarcadores de eficacia para su uso en futuros ensayos clínicos con las nuevas terapias disponibles.

El estudio combinado de diferentes enfoques terapéuticos potenciales, junto con la búsqueda de biomarcadores que puedan ser útiles para la implementación de ensayos clínicos, constituye una estrategia idónea para facilitar el hallazgo de nuevas terapias para una enfermedad neurológica rara y grave sin tratamiento hasta el momento. Esto, a su vez, contribuirá a expandir nuestro conocimiento para que se puedan aplicar terapias similares a otros trastornos neurológicos con afectación mitocondrial.

PLAN DE TRABAJO

Actividades a desarrollar por el laboratorio de Antonio Zorzano (IRB Barcelona)

Título general de la actividad: Identificación de compuestos terapéuticos en la enfermedad COXPD1.

El objetivo de nuestra investigación consiste en identificar compuestos que muestren propiedades beneficiosas en fibroblastos humanos portadoras de mutaciones en el gen GFM1, responsable de la enfermedad mitocondrial denominada COXPD1. En una primera fase, se desarrollará una actividad de cribado partiendo de una quimioteca de 48.000 compuestos existente en nuestro centro. En función de la financiación, este proceso se continuará con la validación de los compuestos “hit” identificados, su clasificación en subgrupos, y su selección ulterior para futuros estudios in vivo.

Actividades a desarrollar por el laboratorio de Gloria González Aseguiolaza (CIMA, Navarra)

Título general de la actividad: Producción de vectores AAV9P31

Construcción de los genomas recombinantes que expresen la proteína EFG1 bajo el control de un promotor de expresión ubicua o un promotor neuroespecífico. Los genomas recombinantes serán encapsidados en una cápside de AAV capaz de cruzar la barrera hematoencefálica, AAV9P31, y llevar el material genético a las neuronas. Los vectores AAV serán producidos, purificados y caracterizados en nuestro laboratorio y enviados al VHIR para el análisis de su potencial terapéutico en el modelo animal.

Actividades a desarrollar por el laboratorio de Ramon Martí (VHIR, Barcelona)

Título general de la actividad: Estudios preclínicos de terapia génica dirigida a cerebro, en el ratón modificado genéticamente *Gfm1*^{R631C/KO}.

El vector será administrado por vía intravenosa en ratones *Gfm1*^{R671C/KO} (N=20 por grupo, 10 machos y 10 hembras), de 6 semanas de edad a una dosis de 5×10^{12} genomas virales/kg. Un grupo paralelo control será tratado con la solución vehículo.

Después de la administración del vector, se monitorizarán el estado de los ratones (inspección visual, comportamiento, peso corporal, etc.) durante 4 semanas, y luego serán sacrificados para obtener tejidos. Se analizarán el cerebro (tejido diana del promotor SYN1) y el hígado (altamente transducido por el serotipo 9 y ya caracterizado en estudios preliminares con AAV9 sin modificar). De acuerdo con los resultados observados, se considerará el análisis de otros tejidos. Se estudiarán las siguientes variables: niveles de proteína EFG1 por western blot y su biodistribución en cerebro por inmunohistoquímica; el número de copias del vector en extractos de ADN y los niveles de estado estacionario de ARNm de GFM1, cuantificación de subunidades de OXPHOS por western blot: COXI (subunidad CIV codificada por ADNmt) y NDUFA10 (subunidad CI codificada por ADNn); complejos OXPHOS ensamblados por electroforesis BN; actividades enzimáticas del complejo OXPHOS y evaluación de la traducción mitocondrial *in organello*.

Actividades a desarrollar por el grupo de Alejandra Darling (Hospital Sant Joan de Déu, Esplugues de Llobregat, Barcelona)

Título general de la actividad: Búsqueda de biomarcadores

Se obtendrán muestras de pacientes con diagnóstico de COXPD1 y otras enfermedades neurodegenerativas asociadas a disfunción mitocondrial primaria, previo consentimiento informado de los pacientes y/o tutores. Utilizando estas muestras se investigará la identificación de biomarcadores potenciales a través de dos tipos de análisis:

(i) Búsqueda de biomarcadores mediante análisis dirigidos.

Se estudiarán tres biomarcadores potenciales principales. Dos de ellos han sido previamente descritos como biomarcadores de disfunción mitocondrial: la determinación de GDF-15 y FGF-21 circulantes ha ayudado mucho al diagnóstico de patologías mitocondriales ya que su sensibilidad es significativamente mayor que otros biomarcadores convencionales como el nivel de lactato venoso. Se estudiará la presencia de ambos biomarcadores en plasma y LCR mediante ELISA utilizando métodos previamente descritos²⁹. Por otra parte, la cadena ligera del Neurofilamento (Neurofilament light chain, NfL) es un biomarcador prometedor en enfermedades neurodegenerativas. Las concentraciones de LCR NfL aumentan proporcionalmente al grado de lesión neuroaxonal e indican daño neuronal. La medición de NfL en sangre puede ser un biomarcador efectivo y mínimamente invasivo, y su estudio podría expandirse a otras condiciones mitocondriales y neurodegenerativas. NfL se estudiará en plasma y LCR de pacientes mediante ELISA como se describió anteriormente³⁰.

(ii) Búsqueda no dirigida de biomarcadores

Los análisis no dirigidos a las muestras biológicas se realizarán en la Plataforma de Metabolómica del CIBERDEM. En un primer paso, analizaremos los metabolitos hidrosolubles por cromatografía líquida o de gases acoplada a espectrometría de masas. Dependiendo de los resultados, pasaríamos al análisis de los componentes lipídicos.

CRONOGRAMA

	Anualidad 1		Anualidad 2		Anualidad 3	
	Primer semestre	Segundo semestre	Tercer semestre	Cuarto semestre	Quinto semestre	Sexto semestre
Objetivo 1: Cribado de compuestos de bajo peso molecular						
Cribado inicial partiendo de una quimioteca de 48.000 compuestos en fibroblastos						
Aplicación de compuesto(s) positivos al modelo murino						
Objetivo 2: Estudios preclínicos de terapia génica in vivo						
Producción de vectores y su caracterización						
Estudio del efecto de los vectores en el modelo murino						
Objetivo 3: Búsqueda de biomarcadores						
Obtención de muestras						
Análisis dirigido						
Análisis no dirigido						

UTILIDAD E IMPACTO DEL PROYECTO

Este proyecto será llevado a cabo por un consorcio multidisciplinario formado por investigadores altamente complementarios: Ramon Martí, Antonio Zorzano (ambos expertos en función mitocondrial y mitocondrial trastornos), Gloria González (reconocida experta en terapia génica), y Alejandra Darling (clínica investigadora que trabaja en un hospital pediátrico de referencia internacional).

El objetivo 1, dedicado a cribar una biblioteca de compuestos generará conocimiento muy útil para futuros proyectos relacionados con la disfunción mitocondrial y enfermedades mitocondriales.

Nuestro proyecto también tiene como objetivo estudiar un nuevo vector diseñado para poder atravesar la barrera hematoencefálica (BBB) y llegar al y llegar al SNC. Es bien conocido en el campo de la terapia génica que los vectores AAV con cápsides naturales, a pesar de sus excelentes propiedades para transducir de manera segura los transgenes deseados al hígado, presentan el inconveniente de que su eficacia para alcanzar otros órganos es mucho menos satisfactoria, y específicamente su incapacidad para cruzar la BBB plantea importantes problemas al tratar de usarlos para enfermedades que afectan el SNC. Nuestro proyecto probará el nuevo serotipo sintético AAV9P31 recombinante, que ha demostrado tener la capacidad de cruzar la BBB, para tratar una enfermedad mitocondrial que afecta el SNC. Por lo tanto, los resultados del proyecto, si se demuestran positivos, serán muy relevantes de cara a expandir este tipo de terapias para otras enfermedades del SNC.

Nuestro tercer objetivo pretende identificar biomarcadores que se correlacionen con la progresión clínica de la enfermedad, lo cual contribuirá a facilitar la implementación de ensayos clínicos y, por tanto, acercará la terapia a los pacientes de estas enfermedades raras.

Los avances del conocimiento antes mencionados constituirán herramientas útiles que pueden extenderse a otras áreas de la investigación biomédica. Específicamente, la identificación de compuestos que puedan restituir la función mitocondrial en sistemas in vitro e in vivo de COXPD1 podrían ampliarse a otras enfermedades mitocondriales. Asimismo, si se demuestra que el serotipo AAV9P31 resulta efectivo en nuestro estudio, ello reforzará esta cápside como una herramienta para otras enfermedades del SNC. Asimismo, la demostración que los biomarcadores identificados en este proyecto son buenos predictores de la evolución clínica de los pacientes, facilitará su uso para otras enfermedades mitocondriales y/o neuromusculares en general.

PRESUPUESTO

Concepto	Centro	Coste
Gastos de personal		
Investigador predoctoral (2 años)	CIMA	60,000.00 €
Investigador postdoctoral (2 años)	IRB	90,000.00 €
Investigador postdoctoral (2 años)	VHIR	90,000.00 €
Investigador predoctoral (2 años)	HSJD	60,000.00 €
Gastos de bienes y servicios		
Coste de la fase inicial de cribado (compuestos de la quimioteca)	IRB	50,000.00 €
Producción, purificación y caracterización de los AAVs	CIMA	20,000.00 €
Mantenimiento de la colonia de ratones	VHIR	24,000.00 €
Experimentos de terapia génica en ratones	VHIR	25,000.00 €
Determinaciones y servicios para la búsqueda de biomarcadores	HSJD	50,000.00 €
Gastos de publicaciones		
Previsión de tres publicaciones open acces		10,000.00 €
Gastos de presentación de resultados a congresos (cuotas de inscripción y gastos de viajes)		
	IRB	5,000.00 €
	CIMA	5,000.00 €
	VHIR	5,000.00 €
	HSJD	5,000.00 €
TOTAL costos directos		499,000.00 €
Costes indirectos institucionales (21% de costos directos)		104,790.00 €
TOTAL costos directos+indirectos		603,790.00 €

REFERENCIAS

1. Antonicka H, Sasarman F, Kennaway NG, Shoubbridge EA. The molecular basis for tissue specificity of the oxidative phosphorylation deficiencies in patients with mutations in the mitochondrial translation factor EFG1. Human molecular genetics 2006;15:1835-1846.
2. Barcia G, Rio M, Assouline Z et al. Clinical, neuroimaging and biochemical findings in patients and patient fibroblasts expressing ten novel GFM1 mutations. Human mutation 2020;41:397-402.

3. Bravo-Alonso I, Navarrete R, Vega AI et al. Genes and Variants Underlying Human Congenital Lactic Acidosis-From Genetics to Personalized Treatment. *Journal of clinical medicine* 2019;8.
4. Brito S, Thompson K, Campistol J et al. Long-term survival in a child with severe encephalopathy, multiple respiratory chain deficiency and GFM1 mutations. *Frontiers in genetics* 2015;6:102.
5. Calvo SE, Compton AG, Hershman SG et al. Molecular diagnosis of infantile mitochondrial disease with targeted next-generation sequencing. *Sci Transl Med* 2012;4:118ra110.
6. Coenen MJ, Antonicka H, Ugalde C et al. Mutant mitochondrial elongation factor G1 and combined oxidative phosphorylation deficiency. *The New England journal of medicine* 2004;351:2080-2086.
7. Galmiche L, Serre V, Beinat M et al. Toward genotype phenotype correlations in GFM1 mutations. *Mitochondrion* 2012;12:242-247.
8. Simon MT, Ng BG, Friederich MW et al. Activation of a cryptic splice site in the mitochondrial elongation factor GFM1 causes combined OXPHOS deficiency. *Mitochondrion* 2017;34:84-90.
9. Smits P, Antonicka H, van Hasselt PM et al. Mutation in subdomain G' of mitochondrial elongation factor G1 is associated with combined OXPHOS deficiency in fibroblasts but not in muscle. *Eur J Hum Genet* 2011;19:275-279.
10. Valente L, Tiranti V, Marsano RM et al. Infantile encephalopathy and defective mitochondrial DNA translation in patients with mutations of mitochondrial elongation factors EFG1 and EFTu. *American journal of human genetics* 2007;80:44-58.
11. Balasubramaniam S, Choy YS, Talib A, Norsiah MD, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ. Infantile Progressive Hepatoencephalomyopathy with Combined OXPHOS Deficiency due to Mutations in the Mitochondrial Translation Elongation Factor Gene GFM1. *JIMD reports* 2012;5:113-122.
12. Kohda M, Tokuzawa Y, Kishita Y et al. A Comprehensive Genomic Analysis Reveals the Genetic Landscape of Mitochondrial Respiratory Chain Complex Deficiencies. *PLoS genetics* 2016;12:e1005679.
13. Ravn K, Schonewolf-Greulich B, Hansen RM et al. Neonatal mitochondrial hepatoencephalopathy caused by novel GFM1 mutations. *Molecular genetics and metabolism reports* 2015;3:5-10.
14. Su C, Wang F. Clinical and molecular findings in a family expressing a novel heterozygous variant of the G elongation factor mitochondrial 1 gene. *Exp Ther Med* 2020;20:173.
15. You C, Xu N, Qiu S et al. A novel composition of two heterozygous GFM1 mutations in a Chinese child with epilepsy and mental retardation. *Brain and behavior* 2020;10:e01791.
16. Soiferman D, Ayalon O, Weissman S, Saada A. The effect of small molecules on nuclear-encoded translation diseases. *Biochimie* 2014;100:184-191.
17. Molina-Berenguer M, Vila-Julia F, Perez-Ramos S et al. Dysfunctional mitochondrial translation and combined oxidative phosphorylation deficiency in a mouse model of hepatoencephalopathy due to Gfm1 mutations. *FASEB J* 2022;36:e22091.
18. Naldini L. Gene therapy returns to centre stage. *Nature* 2015;526:351-360.
19. Cartier N, Hacein-Bey-Abina S, Bartholomae CC et al. Hematopoietic stem cell gene therapy with a lentiviral vector in X-linked adrenoleukodystrophy. *Science* 2009;326:818-823.
20. Biffi A, Montini E, Lorioli L et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy benefits metachromatic leukodystrophy. *Science* 2013;341:1233158.
21. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Science* 2013;341:1233151.
22. Cavazzana-Calvo M, Payen E, Negre O et al. Transfusion independence and HMGA2 activation after gene therapy of human beta-thalassaemia. *Nature* 2010;467:318-322.
23. Rio P, Navarro S, Wang W et al. Successful engraftment of gene-corrected hematopoietic stem cells in non-conditioned patients with Fanconi anemia. *Nat Med* 2019;25:1396-1401.
24. Naso MF, Tomkowicz B, Perry WL, 3rd, Strohl WR. Adeno-Associated Virus (AAV) as a Vector for Gene Therapy. *Biodrugs* 2017;31:317-334.
25. Asokan A, Schaffer DV, Samulski RJ. The AAV vector toolkit: poised at the clinical crossroads. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2012;20:699-708.
26. Toscano MG, Romero Z, Munoz P, Cobo M, Benabdellah K, Martin F. Physiological and tissue-specific vectors for treatment of inherited diseases. *Gene therapy* 2011;18:117-127.

27. Zincarelli C, Soltys S, Rengo G, Rabinowitz JE. Analysis of AAV serotypes 1-9 mediated gene expression and tropism in mice after systemic injection. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* 2008;16:1073-1080.
28. Nonnenmacher M, Wang W, Child MA et al. Rapid evolution of blood-brain-barrier-penetrating AAV capsids by RNA-driven biopanning. *Molecular therapy Methods & clinical development* 2021;20:366-378.
29. Dominguez-Gonzalez C, Badosa C, Madruga-Garrido M et al. Growth Differentiation Factor 15 is a potential biomarker of therapeutic response for TK2 deficient myopathy. *Scientific reports* 2020;10:10111.
30. Abu-Rumeileh S, Giannini G, Polischi B et al. Revisiting the Cerebrospinal Fluid Biomarker Profile in Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: The Bologna Pro-Hydro Study. *J Alzheimers Dis* 2019;68:723-733.