



FONDAZIONE I.R.C.C.S.
ISTITUTO NEUROLOGICO “CARLO BESTA”
ISTITUTO DI RICOVERO E CURA A CARATTERE SCIENTIFICO DI
NATURA PUBBLICA

U.O Neurofisiologia Sperimentale ed epilettologia

Via Celoria, 11 - 20133 Milano - Tel 02 23941 www.istituto-besta.it
C.F. 01668320151 - P.IVA 04376340156

Milano, 3 settembre 2008

Report intermedio per Associazione “Girotondo”

Progetto di ricerca: “Terapia genica di topi transgenici, modelli della Atrofia Muscolare Spinale”

1° periodo: gennaio 2008 – agosto 2008

Premessa. Questo progetto di ricerca nasce dalla scoperta, da parte del nostro gruppo di ricerca (Unità di Neuroanatomia e Patogenesi Molecolare, Fondazione IRCCS Istituto Neurologico “C. Besta”, diretto da Giorgio Battaglia; e Laboratorio di Biologia Molecolare, Istituto di Ricerche Farmacologiche “Mario Negri”, diretto da Enrico Garattini), della proteina a-SMN, o SMN assonale, caratterizzata dalla proprietà di stimolo della assonogenesi motoneuronale. La nuova isoforma proteica è espressa durante lo sviluppo motoneuronale, ed è codificata soprattutto dal gene SMN1; tuttavia, il suo ruolo SMA deve essere ancora stabilito. Per verificare la effettiva rilevanza di questa nuova isoforma proteica nei meccanismi patogenetici che conducono alla SMA, abbiamo intrapreso un progetto di ricerca per verificare la possibilità di una terapia genica in topi transgenici SMA.

Come necessaria premessa ad un progetto ambizioso come questo, abbiamo dapprima stabilito una collaborazione con un gruppo con una specifica esperienza nella terapia genica di modelli animali sperimentali. Il gruppo coordinato da Patrick Aebischer presso lo Swiss Federal Institute of Technology (EPFL) in Lausanne, Svizzera, è uno dei gruppi con maggiore esperienza in questo campo specifico. Per rendere la collaborazione più solida, la dottoressa Veronica Setola, una delle artefici della scoperta di a-SMN, si è trasferita a Losanna, e lavorerà a Losanna per il periodo 2008-2009. Il progetto di ricerca è stato pertanto suddiviso in in 4 parti, rispettivamente:

- 1) preparazione dei costrutti virali ed esperimenti in animali di controllo;
- 2) creazione e mantenimento delle diverse colonie transgeniche SMA;
- 3) terapia genica dei topi “SMA II”;
- 4) terapia genica dei topi “SMA III”.

Risultati ottenuti.

1) preparazione dei costrutti virali ed esperimenti in animali di controllo.

In questi primi 8 mesi sono stati sintetizzati (a Ginevra) 3 diversi tipi di virus AAV6, un particolare sierotipo di virus adeno-associati, che non sono pericolosi per l'uomo e non inducono una risposta immunitaria nell'ospite, contenenti rispettivamente un costrutto esprimente la proteina FL-SMN nativa (a Milano), la proteina α -SMN nativa (a Milano), e la proteina GFP (a Ginevra), quale vettore di controllo. I virus AAV-6 così ottenuti sono stati iniettati in topi di controllo con risultati incoraggianti.

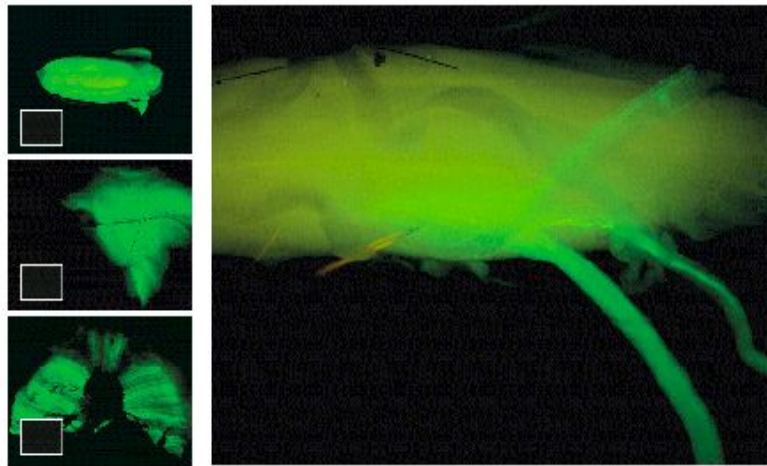


Figura 1. Iniezione intramuscolare e trasporto retrogrado di AAV-6/GFP.

Dopo iniezione periferica in diversi gruppi muscolari del vettore di controllo AAV-6/GFP, il virus si è dimostrato in grado di trasdurre (e quindi di rendere fluorescenti) non solo i gruppi muscolari iniettati (a sinistra) ma anche di essere trasportato in modo retrogrado lungo le radici spinali (a destra) fino al midollo spinale ipsilaterale. In questo esperimento, il tempo di sopravvivenza (successivo all'iniezione periferica) è stato di 1 mese.

Come mostrato nella Fig. 1, dopo iniezione periferica intramuscolare unilaterale e sopravvivenza di circa 1 mese, il vettore virale di controllo AAV-6/GFP è in grado di trasdurre (e quindi di rendere fluorescenti) sia i gruppi muscolari iniettati che le radici ventrali e la parte ventrale del midollo spinale, dopo essere stato trasportato per via retrograda dalla fibrocellula muscolare al motoneurone corrispondente, lungo l'assone motorio contenuto nel nervo e nella radice spinale corrispondente. Ciò dimostra pertanto la fattibilità di un approccio basato sulla somministrazione ed infezione periferica muscolare per poter trasdurre e quindi modificare geneticamente i motoneuroni spinali.

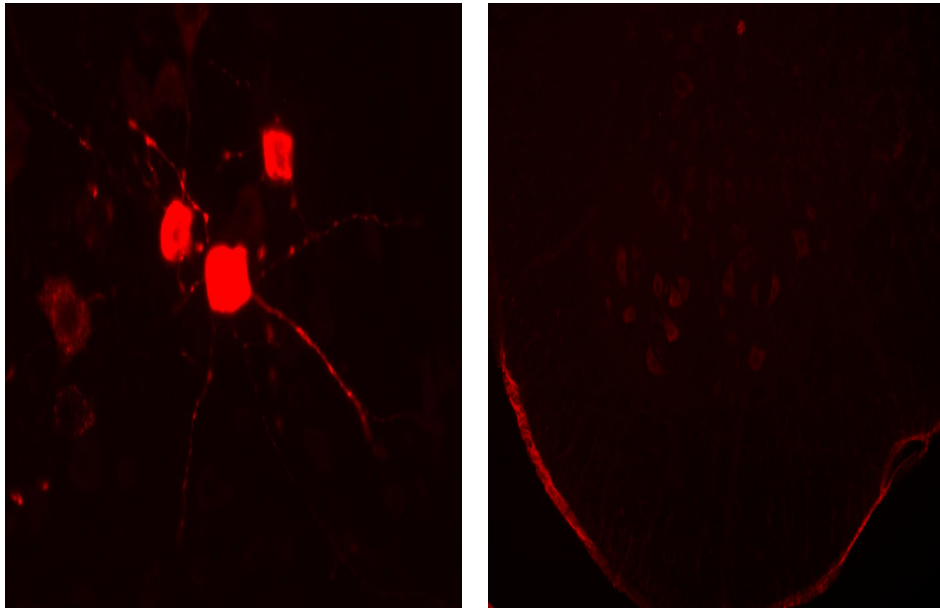


Figura 2. Iniezione intramuscolare e trasporto retrogrado di AAV-6/FL-SMN. Dopo iniezione periferica unilaterale nel muscolo gastrocnemio del vettore AAV-6/FL-SMN, il virus viene trasportato per via retrograda nei motoneuroni corrispondenti, che esprimono abbondanti quantità di FL-SMN localizzata nel corpo cellulare e nei dendriti (a sinistra). Da notare la selettività di lato della marcatura, non presente controlateralmente (a destra), e la differenza di espressione di FL-SMN nei motoneuroni trasdotti (a sinistra) rispetto a quelli non trasdotti (a destra), che esprimono ovviamente solo FL-SMN endogena.

Dopo iniezione periferica unilaterale nel muscolo gastrocnemio dell'arto inferiore sinistro, anche i virus esprimenti rispettivamente la proteina FL-SMN (Fig. 2) e a-SMN (Fig. 3) sono in grado di trasdurre la fibrocellula muscolare ed il corrispondente pool motoneuronale ipsilaterale. Non abbiamo osservato significative differenze tra AAV-6/FL-SMN e AAV-6/a-SMN né nella quantità di proteina trasdotta a livello muscolare periferico (dati non mostrati) né come numero di motoneuroni trasdotti a livello spinale. Abbiamo tuttavia osservato una differenza significativa a livello qualitativo: mentre FL-SMN viene espressa a livello dei corpi cellulari e dei dendriti dei motoneuroni trasdotti (Fig. 2, a sinistra), a-SMN è anche presente a livello assonale nelle radici ventrali, dove è trasportata per via assonale anterograda (Fig. 3). Questo dato dimostra anche *in vivo* quello che avevamo già osservato *in vitro*, cioè la differente localizzazione sub-cellulare delle due diverse isoforme proteiche SMN.

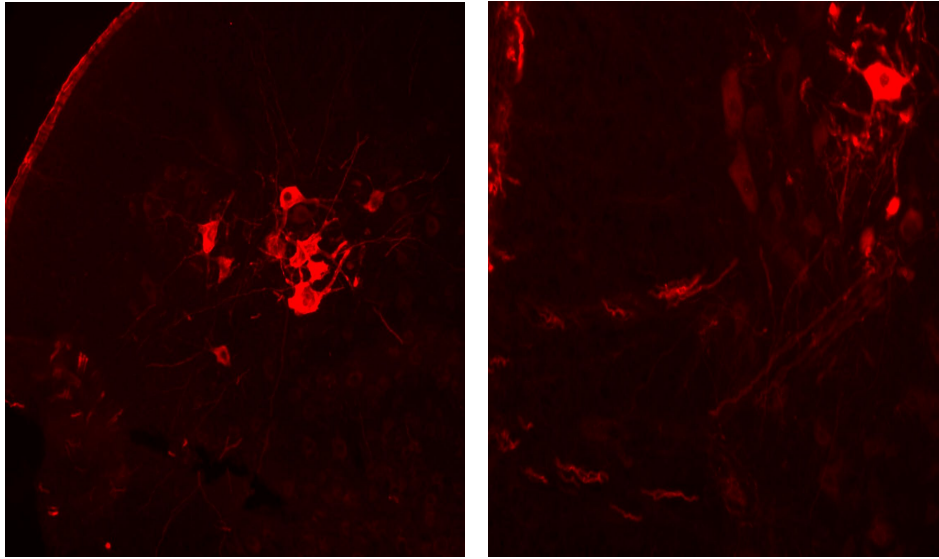


Figura 3. Iniezione intramuscolare e trasporto retrogrado di AAV-6/a-SMN. Dopo iniezione periferica unilaterale nel muscolo gastrocnemio del vettore AAV-6/FL-SMN, il virus viene trasportato per via retrograda nei motoneuroni corrispondenti, che esprimono abbondanti quantità di a-SMN sia nel corpo cellulare che nei dendriti. Da notare, a differenza di quanto osservato dopo trasduzione con FL-SMN, a-SMN si localizza in modo molto evidente a livello assonale, come dimostrato dalla marcatura delle fibre che lasciano il midollo spinale per formare la radice ventrale (a destra).

2) creazione e mantenimento delle diverse colonie transgeniche SMA.

Tra i modelli transgenici murini per la SMA al momento disponibili, sono state selezionate due linee transgeniche, entrambe caratterizzate dalla delezione omozigote del gene murino *Smn* ($Smn^{-/-}$), e dalla presenza di due copie del gene centromerico umano *SMN2* (che nell'uomo è in grado di modulare ma non di impedire lo sviluppo della malattia): **i)** la prima linea è inoltre caratterizzata dalla aggiunta di un cDNA derivato dal gene *SMN2* umano mancante dell'esone 7 ($Smn^{-/-}/SMN2$ low copy/*SMN2* delta7; Le et al, *Hum Mol Genet* 2005; Jackson stock number 005025); questi topi hanno una sopravvivenza breve (intorno alle due settimane), con segni clinici di debolezza muscolare ad andamento rapidamente progressivo nella seconda settimana di vita, e sono considerati un modello di SMA di tipo II; **ii)** la seconda linea è invece caratterizzata dalla aggiunta di un cDNA codificante per una proteina FL-SMN mutata (SMN A2G) presente in pazienti affetti da SMA di tipo 1 ($Smn^{-/-}/SMN2$ low copy/*SMN* A2G; Monani et al, *J Cell Biol* 2003; Jackson stock number 005026); questi topi hanno una sopravvivenza decisamente più lunga (227 giorni di sopravvivenza media), segni morfologici di degenerazione motoneuronale ed elettromiografici di denervazione intorno ai 3-4 mesi di età, e sono considerati un modello di SMA di tipo III.

Per poter più efficacemente portare avanti il programma di ricerca, abbiamo deciso di portare avanti la sperimentazione sui topi SMA II a Losanna, e quella sugli SMA III a Milano. Per ottenere i topi transgenici SMA III è necessario incrociare topi di genotipo $Smn^{+/-}/SMN2^{+/-}/SMN$ A2G^{+/+} con topi di genotipo $Smn^{+/-}/SMN2^{+/-}$, per ottenere in linea teorica (secondo un criterio Mendeliano) il 25% di topi $Smn^{+/-}$

$^{+}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$, il 50% di topi $Smn^{+/-}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$, e il 25% di topi affetti $Smn^{-}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$. Dopo aver incrociato i topi breeder, abbiamo finora ottenuto tre nidiate con la seguente frequenza dei genotipi

- $Smn^{+/+}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$ 21%
- $Smn^{+/-}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$ 58%
- $Smn^{-}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$ 21%

che è molto vicina alla frequenza attesa. Abbiamo osservato un certo grado di mortalità nei primi giorni di vita (intorno al 20%), ma il dato è troppo preliminare ed il numero di colonie troppo basso per poter trarre conclusioni. I topi con genotipo $Smn^{-}/SMN2^{+/+}/SMN\ A2G^{+/-}$ saranno quelli sottoposti al trattamento con vettori virali AAV-6/FL-SMN e AAV-6/a-SMN.

3) *terapia genica dei topi "SMA II"*. Questa parte del programma viene svolta dalla dr.ssa Veronica Setola a Losanna, in collaborazione con il dr. Chris Towne, sotto la supervisione di Patrick Aebischer presso lo Swiss Federal Institute of Technology (EPFL) a Losanna. Sono stati iniettati per il momento 12 topi SMA di tipo II ($Smn^{-}/SMN2/\delta 7$) con il costrutto AAV-6/FL-SMN (in blu nella Fig. 4) e 4 topi AAV-6/a-SMN (in rosso nella Figura 4).

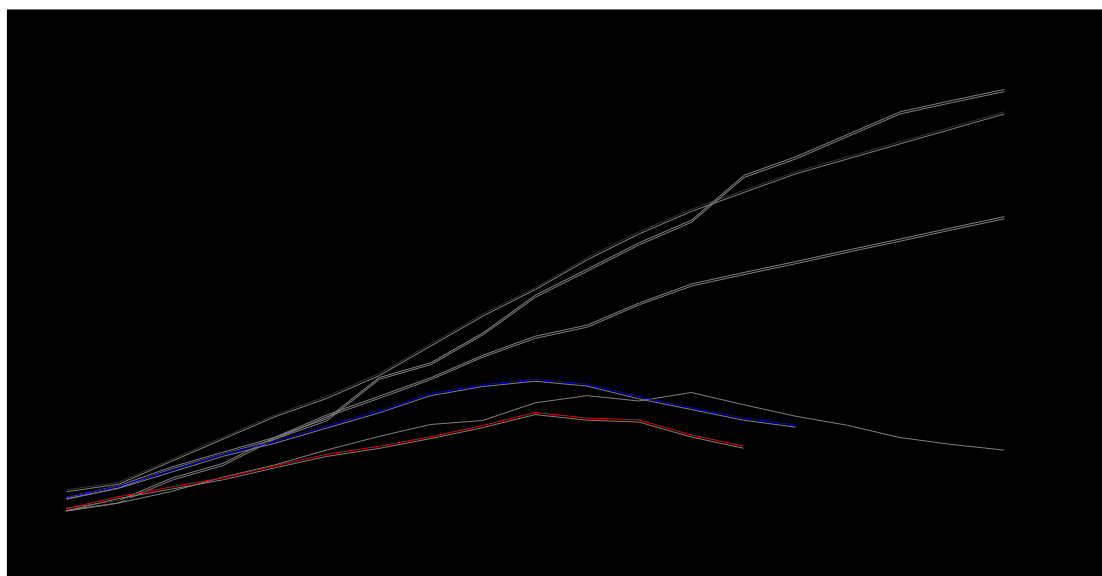


Figura 4. Evoluzione del peso corporeo di topi $Smn^{-}/SMN2\ low\ copy/SMN2\ \delta 7$ (topi SMA di tipo II) dopo iniezione intramuscolare di differenti costrutti AAV-6/SMN. Sequencing analysis (upper) of a representative clone obtained with 3'-RACE from the human NB4 cell line demonstrating exon 5 skipping (left) and the C at position +6 in exon7 (right). The human a-SMN transcripts are schematically represented (lower).

I dati sono pertanto molto preliminari e vengono qui riportati solo nell'ottica di illustrare lo stato di avanzamento del progetto di ricerca. Tuttavia, il fatto che la curva di incremento/decremento ponderale dei topi SMA II sia sostanzialmente sovrapponibile a quella dei topi trattati sia con il vettore AAV-6/FL-SMN (in blu nella Fig. 4) che con AAV-6/a-SMN (in rosso nella Figura 4) suggerisce la possibilità che questo approccio terapeutico non sia efficace.

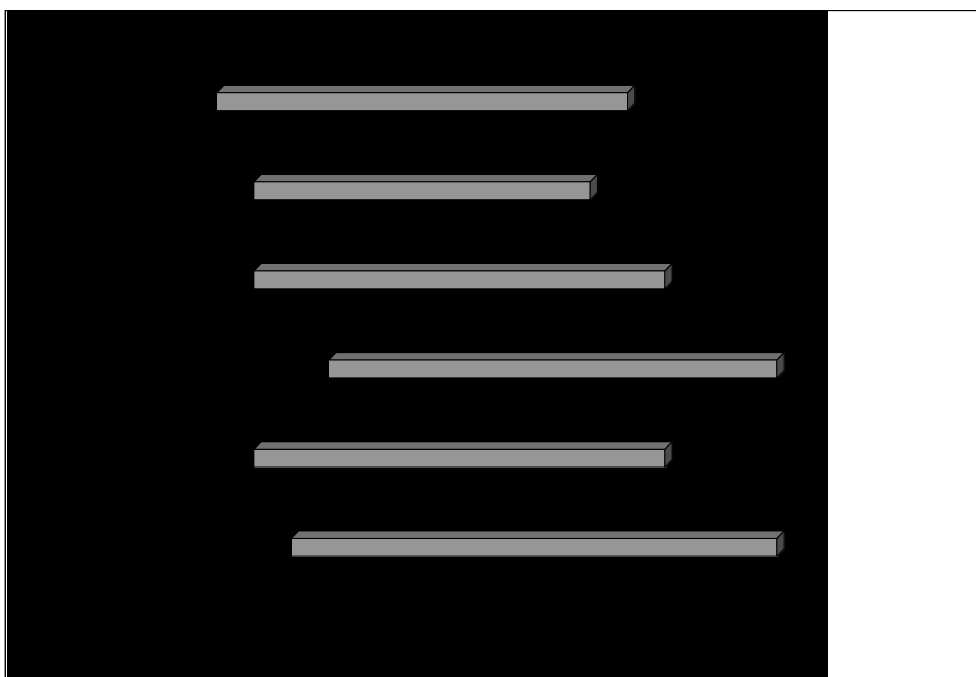
E' possibile che il tempo di sopravvivenza (uguale o inferiore a due settimane) di questi topi non rappresenti un tempo sufficiente alla espressione da parte dei motoneuroni di entrambe le proteine SMN trasdotte. Infatti le iniezioni intramuscolari sono state effettuate a P2, ed è da ricordare che le iniezioni negli esperimenti sui topi di controllo (vedi sopra) erano state effettuate a P15 ed il tempo di sopravvivenza era sempre stato non inferiore ai 30 giorni. E' attualmente in corso l'analisi morfologica e in western blot dei topi SMA II trattati con i diversi vettori, per verificare quantitativamente e qualitativamente la trasduzione di FL-SMN e a-SMN. Se venisse confermata l'insufficienza della durata del periodo di azione del virus, verrà presa in considerazione la possibilità di effettuare il trattamento più precocemente (per via sistemica) prima della nascita della nidata.

4) terapia genica dei topi "SMA III". Questa parte del programma è svolta direttamente a Milano. I topi SMA di tipo III (*Smn*^{-/-}/*SMN2*^{+/+}/*SMN A2G*^{+/-}) hanno una sopravvivenza molto più lunga dei tipo SMA II, ma il criterio della sopravvivenza in questi topi non è un buon criterio per valutare la efficacia di un trattamento, essendo essa variabile da animale ad animale. Pertanto, devono essere valutati da un punto di vista sia comportamentale che neurofisiologico per giudicare la reale efficacia della terapia genica. Per questo, stiamo mettendo a punto la valutazione elettromiografica (EMG), per poter avere a disposizione dei parametri quantitativi e paragonabili di valutazione (Fig. 5).



Figura 5. Analisi EMGrafica di topi SMA di tipo III. I topi SMA di tipo III sono caratterizzati, a riposo e sotto anestesia leggera, da potenziali bifasici di fibrillazione (a sinistra) e potenziali monofasici positivi di tipo "Jasper" (a destra in basso), entrambi segni di denervazione cronica; e da potenziali giganti di unità motoria (in alto a destra), segno di reinnervazione da parte delle fibre motorie superstiti.

L'analisi EMGrafica dimostra che i topi SMA di tipo III adulti hanno caratteristiche elettrofisiologiche muscolari del tutto simili a quelle riscontrate nei pazienti SMA, cioè segni di denervazione cronica in fase attiva (potenziali di fibrillazione e di tipo "Jasper", vedi Fig. 5) nella fibra muscolare a riposo, e segni di re-innervazione con formazione di unità motorie ingrandite (potenziali giganti di unità motoria, vedi Fig. 5). L'evoluzione di tali anomalie nel tempo nei muscoli trattati e non trattati e la contemporanea valutazione dei CMAPs (compound muscle action potentials) nel tempo fornirà i parametri di valutazione per l'efficacia della terapia genica nei prossimi mesi.



La Figura 6 mostra il protocollo sperimentale che verrà seguito. Le iniezioni verranno eseguite a P30, dapprima unilateralmente in posizione distale e prossimale nell'arto inferiore, per avere un controllo interno costituito dall'arto inferiore controlaterale, iniettato con vettore di controllo. In una seconda fase, se il trattamento dovesse rivelarsi efficace, verranno trattati animali con iniezioni intramuscolari multiple e bilaterali. Ogni singolo animale verrà seguito longitudinalmente ed analizzato ogni 30 giorni (P30 – pre-trattamento -; P60; P90; P120....fino al sacrificio finale), sia da un punto di vista EMGrafico che comportamentale. Alla fine dell'esperimento gli animali saranno sacrificati, i muscoli analizzati in western blot per valutare l'espressione delle diverse proteine trasdotte, i midolli spinali (ed i nervi corrispondenti) analizzati da un punto di vista morfologico per il numero di motoneuroni, e l'espressione, la localizzazione subcellulare, ed il trasporto assonale delle proteine trasdotte.

Giorgio Stefano Battaglia, MD
Molecular Neuroanatomy and Pathogenesis Unit
IRCCS Foundation Neurological Institute "C. Besta"
Via Temolo 4, 20126 Milano, Italy
Via Celoria 11, 20133 Milano, Italy