



Università Degli Studi di Milano  
Scuola di Dottorato in Medicina  
Molecolare



Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biomediche  
Curriculum di Genomica & Proteomica  
Ciclo XXIV  
Anno Accademico 2010-2011

**Dottorando:** Chiara SIMONE

**Generazione e correzione di cellule staminali  
pluripotenti indotte non virali da paziente SMA come  
modello di malattia e sorgente per la terapia cellulare**

**Direttore della Scuola:** Ch.mo Prof. Mario Clerici

**Tutore:** Prof. Giacomo COMI

**Correlatore:** Dott.ssa Stefania CORTI

## SOMMARIO

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa relativamente frequente nonché la prima causa di morte per malattia genetica nell'infanzia. E' una patologia genetica autosomica recessiva causata da mutazioni nel gene SMN 1 (Survival Motor Neuron 1) che causano la deplezione della proteina SMN a cui consegue la degenerazione selettiva dei motoneuroni del midollo spinale. I pazienti affetti da SMA sono caratterizzati clinicamente da ipostenia muscolare, ipotonia e paralisi progressiva. Attualmente non esistono cure efficaci per questa malattia.

Nel genoma umano sono presenti due copie del gene SMN: SMN1 e SMN2. Il gene SMN2 differisce dal gene SMN1 per pochi nucleotidi tra cui un nucleotide specifico nell'esone 7 che causa un'alterazione di splicing. Di conseguenza è prodotto solo il 10% della proteina full-length e il restante 90% è un trascritto mancante dell'esone 7 (SMN $\Delta$ 7) non funzionale. Sebbene i modelli animali siano molto utili per lo studio della patogenesi e per lo screening farmacologico, presentano importanti limitazioni nel ricapitolare la malattia in quanto non possiedono il gene SMN2, che di conseguenza deve essere introdotto artificialmente. Le recenti tecniche di riprogrammazione utilizzate per ottenere cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) da cellule umane adulte permettono di ottenere cellule paziente specifiche da utilizzare come modello di malattia, come sorgente cellulare per strategie cellulo-mediate e per lo studio di terapie geniche. In questo lavoro abbiamo generato iPSC con metodo non virale da un paziente SMA di tipo 1 e dal padre portatore eterozigote e abbiamo dimostrato il loro differenziamento in motoneuroni. Inoltre abbiamo corretto geneticamente le iPSC utilizzando un oligonucleotide single-strand che si lega in modo specifico alla sequenza target (SMN2) e agisce come stampo per la correzione nucleotidica. Le iPSC sottoposte a questa modificazione genetica risultano corrette, non contengono sequenze esogene e sono indistinguibili dalle iPSC sane. Dato che le iPSC rappresentano una promettente fonte cellulare sia per lo studio patogenetico delle malattie motoneuronali, che per lo sviluppo di strategie di trapianto abbiamo generato motoneuroni dalle iPSC-SMA, iPSC-corrette e iPSC-WT utilizzando un protocollo di differenziamento precedentemente sviluppato per le cellule staminali embrionali umane (hES). Successivamente abbiamo determinato se i motoneuroni derivati dalle iPSC potessero integrarsi e sopravvivere nel midollo spinale di un modello murino di SMA, l'effetto dell'ambiente malato sulle cellule trapiantate e vice-versa, e infine se il trapianto potesse migliorare il fenotipo della malattia. Abbiamo effettuato il trapianto nel midollo spinale di topi SMA di un giorno di vita, osservando che il trapianto di motoneuroni wild-type e corretti migliora la sopravvivenza e il fenotipo dei topi SMA. Abbiamo inoltre valutato la sopravvivenza e il mantenimento di un appropriato fenotipo delle cellule trapiantate.

In conclusione tutti questi risultati dimostrano la possibilità di ottenere iPSC paziente specifiche prive di elementi esogeni, la loro correzione e il loro differenziamento in motoneuroni. Abbiamo inoltre dimostrato che il trapianto di

---

## SOMMARIO

---

quest'ultimi migliora il fenotipo SMA e che possono quindi essere utilizzati per lo sviluppo di un'efficace terapia per la SMA e le altre malattie del motoneurone.

## ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is among the most common genetic neurological diseases causing infant mortality. SMA is an autosomal recessive genetic disorder caused by mutations in the survival motor neuron 1 gene (SMN1), leading to the depletion of survival motor neuron (SMN) protein and resulting in the selective degeneration of spinal cord motor neurons. Patients with SMA exhibit muscle weakness and hypotonia. There is no cure for this disorder, which is devastating for patients and their families and a serious societal health problem. The human genome also harbors the SMN2 gene, which is almost identical to SMN1 except for a single nucleotide difference in SMN2. The splicing change resulting from this difference yields only 10% of the full-length protein and high levels of an unstable, truncated protein lacking exon 7 (SMN $\Delta$ 7). Although worms, flies, and mice are useful for studying disease pathogenesis and drug screening, they have important limitations in recapitulating human diseases. One is that they lack SMN2, which can be introduced only with transgenic modifications. The possibility of reprogramming mature somatic cells to generate induced pluripotent stem cells (iPSCs) has enabled derivation of disease-specific pluripotent cells, offering unprecedented access to modeling human disease and for cell and gene therapy applications. Here, we successfully generated human SMA-iPSCs from a type 1 SMA patient and his unaffected father, using non-integrating episomal vectors and demonstrated their differentiation into motoneurons. Moreover, we employed single-stranded oligonucleotides to correct defective SMN1, the SMA gene, using SMN2. Corrected cell lines contained no exogenous sequences and appeared indistinguishable from healthy iPSCs. Non-viral SMA-iPSC-derived motor neurons reproduced disease-specific features while corrected SMA-specific-iPSCs gave rise to phenotypically rescued motor neurons *in vitro* and *in vivo*. Our next goal was to determine whether MNs derived from iPSCs survive and engraft appropriately within the SMA spinal cord, the effect of disease environment on grafted cells and vice versa, and whether transplantation can ameliorate the disease phenotype in SMA transgenic mice. iPSC-purified motoneurons were used for transplantation into the spinal cords of 1-day-old SMA mice. Transplantation of wild-type and corrected SMA motor neurons extended lifespan and ameliorated the phenotype of SMA mice. These results offer proof-of-concept that generating patient-specific iPSCs and motor neurons free of exogenous elements may be possible, with potential for research and clinical applications.

**INDICE**

<b>SOMMARIO</b> .....	<b>I</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>II</b>
<b>INDICE</b> .....	<b>III</b>
<b>LISTA SIMBOLI</b> .....	<b>V</b>
<b>1. INTRODUZIONE</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Atrofia Muscolare Spinale (SMA)</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Basi genetiche della SMA</b> .....	<b>3</b>
<b>1.3 Il gene SMN</b> .....	<b>3</b>
1.3.1 Mutazioni del gene SMN1 nei pazienti SMA.....	4
1.3.2 Lo splicing alternativo del gene SMN2.....	5
<b>1.4 La diagnosi genetica (molecolare) della SMA</b> .....	<b>7</b>
<b>1.5 La proteina SMN</b> .....	<b>7</b>
1.5.1 Il ruolo della proteina SMN nella patogenesi della SMA.....	9
1.5.1.1 SMA come diretta conseguenza del difetto nella biogenesi delle snRNP9	
1.5.1.2 SMA come conseguenza di una perdita di funzione specifica di SMN che	
porta ad un'alterazione del citoscheletro motoneuronale.....	10
<b>1.6 I modelli animali</b> .....	<b>11</b>
<b>1.7 Gli approcci terapeutici</b> .....	<b>12</b>
1.7.1 Terapia farmacologica.....	13
1.7.2 Terapia cellulare.....	15
1.7.2.1 Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS).....	15
1.7.3 Terapia genica.....	17
1.7.3.1 Correzione genica mirata (TGC).....	18
1.7.3.2 Possibili campi di applicazione della TGC.....	19
<b>2. OBIETTIVI DELLO STUDIO</b> .....	<b>20</b>
<b>3. MATERIALI E METODI</b> .....	<b>21</b>
<b>3.1 Produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)</b> .....	<b>21</b>
3.1.1 Cariotipo e DNA fingerprint.....	21
3.1.2 PCR dei vettori episomali.....	21
3.1.3 Generazione di Embryoid Bodies e formazione di teratomi.....	21
3.1.4 Immunoistochimica delle iPSC e dei loro derivati.....	22
<b>3.2 Correzione delle iPSC-SMA</b> .....	<b>22</b>
3.2.1 Purificazione degli acidi nucleici.....	22
3.2.2 Digestione con enzimi di restrizione.....	22
3.2.3 Sequenziamento del DNA.....	23
3.2.4 Western Blot.....	23
3.2.5 Immunofluorescenza e quantificazione dei gems.....	23

<b>3.3 Differenziamento di cellule iPS in motoneuroni e successiva caratterizzazione.....</b>	<b>24</b>
3.3.1 Purificazione dei motoneuroni.....	24
3.3.2 Analisi fenotipica dei motoneuroni.....	24
<b>3.4 Modelli Animali.....</b>	<b>25</b>
<b>3.5 Trapianto di motoneuroni derivati dalle iPSC in topi SMA.....</b>	<b>25</b>
3.5.1 Analisi della sopravvivenza.....	26
3.5.2 Analisi della forza dei topi SMA.....	26
3.5.3 Analisi dell'attività locomotoria spontanea.....	26
3.5.4 Analisi dei tessuti.....	26
3.5.5 Analisi istologica e conta dei motoneuroni.....	27
3.5.6 Analisi istologica dei muscoli.....	27
<b>3.6 Co-coltura tra motoneuroni primari derivati da topi SMA e motoneuroni umani.....</b>	<b>27</b>
3.6.1 Misurazione della lunghezza e della crescita assonale.....	27
3.6.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).....	28
3.6.3 Anticorpi neutralizzanti.....	28
<b>3.7 Analisi statistica.....</b>	<b>28</b>
<b>4. RISULTATI.....</b>	<b>29</b>
<b>4.1 Produzione non-virale e caratterizzazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC).....</b>	<b>29</b>
<b>4.2 Conversione genica di SMN2 in SMN1 mediante ODN.....</b>	<b>34</b>
<b>4.3 Generazione di motoneuroni spinali da cellule iPS trattate e non, loro differenziamento, caratterizzazione e purificazione.....</b>	<b>37</b>
4.3.1 Generazione di motoneuroni spinali.....	37
4.3.2 Caratterizzazione dei motoneuroni.....	39
4.3.3 Purificazione dei motoneuroni.....	40
<b>4.4 Differenze specifiche tra motoneuroni SMA, motoneuroni wild type e motoneuroni trattati con ODN.....</b>	<b>41</b>
<b>4.5 Trapianto di motoneuroni derivati dalle iPSC in un modello murino di SMA.....</b>	<b>42</b>
4.5.1 I motoneuroni trapiantati si integrano nel midollo spinale dei topi SMA ...	44
4.5.2 I motoneuroni trapiantati hanno un effetto positivo sui motoneuroni SMA e sulle loro connessioni con i muscoli.....	45
4.5.3 I motoneuroni umani producono fattori neuroprotettivi che possono contribuire all'effetto positivo associato al loro trapianto.....	46
<b>5. DISCUSSIONE.....</b>	<b>47</b>
<b>6. CONCLUSIONI.....</b>	<b>53</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>55</b>
<b>PUBBLICAZIONI.....</b>	<b>75</b>

## LISTA SIMBOLI

SMA: Atrofia Muscolare Spinale  
SMN: Survival Motor Neuron  
NF: neurofilamento  
FL: full-length  
snRBPs: ribonucleoproteine nucleari  
NMJ: giunzione neuromuscolare  
AchR: recettore per l'acetilcolina  
SLA: Sclerosi Laterale Amiotrofica  
NSC: cellule staminali neurali  
hESC: cellule staminali embrionali umane  
iPSC: cellule staminali pluripotenti indotte  
RA: all'acido retinoico  
Shh: sonic hedgehog  
OCT4: octamer-binding transcription factor 4  
SOX2: sex determining region Y - box 2  
NANOG: homeobox protein nanog  
Klf4: krueppel-like factor 4  
AVV: vettore virale adeno-associato  
TGC: correzione genica mirata  
ODN: oligodesossiribonucleotidi  
iPSC: cellule staminali pluripotenti indotte  
iPSC-WT: wild-type iPSC  
iPSC-SMA: iPSC con spinal muscular atrophy  
iPSC-TR: iPSC trattate con ODN  
EB: embryoid bodies  
MN: motoneuroni  
NT3/4: neurotrofina 3/4  
VEGF: fattore di crescita dell'endotelio vascolare  
NGF: fattore di crescita dei nervi  
CTNF: signaling of human ciliary neurotrophic factor  
TGF- $\alpha$ : transforming growth factor- $\alpha$   
BDNF: brain-derived neurotrophic factor  
GDNF: glial-derived neurotrophic factor  
IGF1: insulin-like growth factor-1  
TA: tibiale anteriore  
LPS: lipopolisaccaridi  
TuJ1:  $\beta$ -Tubulina IIIb  
MAP2: microtubule associated protein 2  
HB9: homeobox transcription factor  
OLIG2: oligodendrocyte transcription factor 2  
NeuN: neuronal nuclear antigen

---

## LISTA SIMBOLI

---

ChAT: colina acetiltransferasi  
GFP: green fluorescent protein



## 1. INTRODUZIONE

### 1.1 *Atrofia Muscolare Spinale (SMA)*

Le Atrofie Muscolari Spinali (SMA) sono un gruppo di malattie neuromuscolari ereditarie caratterizzate da atrofia e ipostenia muscolare, generalmente simmetrica, dovute alla degenerazione progressiva dei motoneuroni del midollo spinale e del tronco encefalico, che possono presentarsi in maniera eterogenea sia dal punto di vista clinico (età di esordio, severità di malattia e sede principale dell'interessamento muscolare) che genetico (modalità di trasmissione e difetto genico responsabile).

La forma più comune, che fa parte delle SMA prossimali con esordio nell'infanzia, è ereditata in modo autosomico recessivo (SMA5q, OMIM #253300) e la sua incidenza è di 1:6000 nati vivi, mentre quella dei portatori è di 1:35 [1,2].

Il difetto genetico consiste in una mutazione o delezione omozigote a carico della copia telomerica (SMN1) del gene SMN (survival motor neuron) sul cromosoma 5q, che determina una deplezione della proteina SMN [3].

Le numerose altre forme di atrofia muscolare spinale che colpiscono spesso diversi gruppi di neuroni e muscoli, hanno diverse basi genetiche.

Poiché il fenotipo clinico è estremamente variabile, le SMA sono state suddivise in quattro gruppi dall'International SMA Consortium in base all'età di esordio, al raggiungimento di specifiche attività motorie (sedersi, camminare) e all'età di decesso [4]:

- SMA di tipo I o di Werdnig-Hoffmann: forma più grave, associata alla delezione dell'esone 7 nel gene SMN1 nel 95% dei casi. Esordio entro i sei mesi d'età, decesso entro i due anni di età;
- SMA di tipo II: forma intermedia, autosomico recessiva, associata alla delezione dell'esone 7 del gene SMN1 per il 90% dei casi, Esordio tra i 6 e i 18 mesi d'età, raggiungimento della terza o quarta decade di vita;
- SMA di tipo III o di Kugelberg-Welander: forma più lieve, autosomico recessiva, associata alla delezione nel gene SMN1 nell'80-90% dei casi. Esordio prima dei tre anni di età (tipo IIIa) o dopo i tre anni di età (tipo IIIb), aspettativa di vita non ridotta;
- SMA di tipo IV: forma adulta. Esordio oltre i 30 anni di vita, aspettativa di vita pressoché normale.

Il termine SMA viene spesso usato per indicare solo la forma più comune tra queste malattie (SMA 5q) ed è in tal senso che verrà usato in seguito.

Clinicamente la SMA è caratterizzata da un interessamento progressivo e simmetrico dei muscoli, con ipotrofia e ipostenia, che determina perdita del controllo volontario dei movimenti degli arti e del tronco, del controllo posturale, della deglutizione e della respirazione. Rimangono, invece, indenni le funzioni intellettive [5,6] così come non vi è interessamento dei neuroni sensitivi e del fascio piramidale (assenza di segni da coinvolgimento del primo motoneurone). L'ipostenia agli arti ha distribuzione simmetrica e prossimale, ed interessa

principalmente gli arti inferiori. Sono coinvolti anche i muscoli del tronco, determinando un quadro di debolezza della muscolatura intercostale, mentre l'interessamento bulbare provoca atrofia e fascicolazioni della lingua. In molti pazienti è presente tremore delle mani, quando gli arti sono estesi. I riflessi tendinei profondi sono ridotti o assenti e il riflesso plantare, se presente, è in flessione. La muscolatura respiratoria è spesso coinvolta soprattutto in fase avanzata della malattia ed è responsabile della morte per insufficienza respiratoria, mentre la muscolatura del volto, il muscolo cardiaco e liscio non sono interessati.

La forma infantile acuta (tipo I o di Werdnig-Hoffmann) è la forma più grave ed è presente nel 50% dei pazienti [5]. E' associata alla delezione dell'esone 7 nel gene SMN1 nel 95% dei casi. L'esordio si ha entro i sei mesi d'età, ma frequentemente la malattia si manifesta entro il primo mese. Circa un terzo dei pazienti mostra una riduzione dei movimenti fetali durante la gravidanza, altri presentano ipotonia e ipostenia prossimale dei cingoli ed areflessia alla nascita ("floppy baby"). La progressione verso la paralisi generalizzata degli arti e del tronco è rapida. Tipicamente la paralisi dei muscoli intercostali, con il relativo risparmio del diaframma che garantisce la respirazione, determina una deformità del tronco che rimane schiacciato lateralmente e non segue i movimenti respiratori, mentre l'addome si rigonfia (petto "a campana" con respirazione paradossa). Il coinvolgimento bulbare si manifesta con ipotrofia e fascicolazioni della lingua. Non viene mai acquisita la capacità di assumere la posizione seduta e vi è areflessia generalizzata. Spesso i bambini nelle fasi terminali della malattia giacciono immobili e necessitano di alimentazione con sondino naso-gastrico o PEG. Di solito il decesso avviene entro i due anni di età per insufficienza respiratoria, spesso aggravata da infezioni respiratorie ricorrenti.

L'analisi dei tessuti del paziente SMA mostra, a livello delle corna anteriori del midollo spinale, gliosi in assenza di segni di demielinizzazione e diminuzione del numero di motoneuroni. I motoneuroni superstiti rivelano sia segni di degenerazione, indicativi di un processo di morte neuronale continuativo, che segni di immaturità: sono di dimensioni ridotte, picnotici e con sostanza di Nissl poco sviluppata.

L'analisi degli assoni a livello delle radici ventrali mostra fascicoli multiassonali avvolti da una singola cellula di Schwann, una minor densità assonale ed un'alta percentuale di assoni poco mielinizzati. L'analisi degli assoni a livello delle giunzioni neuromuscolari mostra una povera arborizzazione ed un accumulo pre-sinaptico di aggregati di neurofilamenti (NF). Le placche motorie sono piccole e strutturalmente poco sviluppate.

Alla biopsia muscolare le fibre muscolari scheletriche mostrano caratteristiche fetali: appaiono molto piccole e con un solo nucleo posto centralmente; sono inoltre presenti la desmina e la vimentina, proteine che vengono normalmente downregolate durante lo sviluppo muscolare normale. Inoltre sono presenti gruppi di fibre ipertrofiche in un contesto più generale di fibre atrofiche.

## 1.2 Basi genetiche della SMA

Circa un secolo dopo le prime descrizioni cliniche della malattia nel 1990 venne identificato, grazie a studi di linkage, il locus del gene causativo della SMA, localizzato a livello di una complessa regione del cromosoma 5q (5q11.2-13.2) [7-9]. Solo nel 1995 il gene denominato SMN (Survival Motor Neuron), che mappa in tale regione, venne identificato come gene responsabile della malattia [10-12]. Nell'uomo questa regione, altamente instabile, contiene due grandi frammenti genomici invertiti (duplicazione invertita) che contengono sequenze ripetitive multicopy, sequenze retrotrasposoni, pseudogeni e geni, tutti presenti in due copie: centromerica e telomerica (Figura 1). Per tale motivo può essere soggetta a riarrangiamenti intracromosomici che includono la duplicazione genica, la conversione genica e le delezioni de novo [13,14].

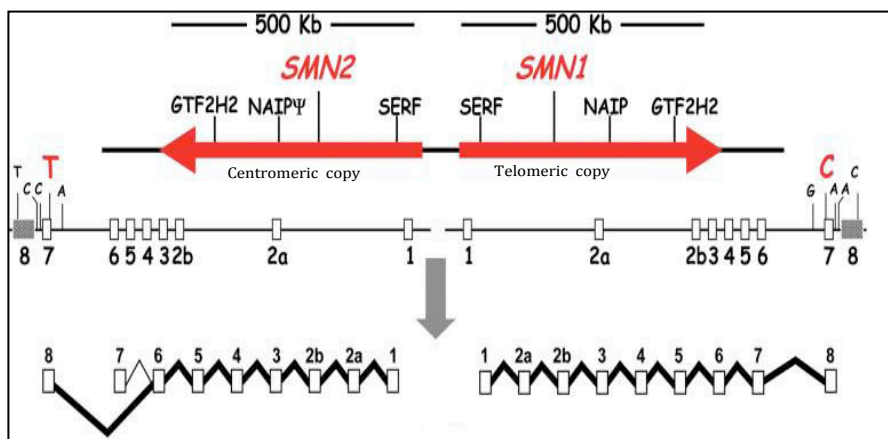


Figura 1. Il gene SMN

## 1.3 Il gene SMN

Il gene SMN è costituito da nove esoni (esone 1, 2a, 2b 3-8) e otto introni, copre una regione genomica di circa 20 kb e il codone di stop si trova alla fine dell'esone 7. Nell'uomo il gene è presente in 2 copie: SMN1 e SMN2 di cui una telomerica (SMN1) e una centromerica (SMN2).

Il grado di analogia delle due copie di SMN è molto elevato sia a livello delle regioni codificanti che delle sequenze introniche e dei promotori: differiscono per solo cinque nucleotidi, di cui uno solo sito nella regione codificante del gene [15]. Tutti questi cinque nucleotidi sono localizzati entro la regione 3' del gene e nessuno di essi altera la sequenza amminoacidica predetta. Solo la sostituzione C-T in posizione +6 dell'esone 7 (c.840C>T) nel gene SMN2 è rilevante dal punto di vista funzionale [16]. Infatti nonostante sia una mutazione silente che non altera la

sequenza aminoacidica della proteina tradotta, è localizzata a livello di uno splicing enhancer esonico e determina dunque spesso uno splicing alternativo del pre-mRNA di SMN2, che taglia l'esone 7.

Ne consegue che il gene SMN1 produce un trascritto full-length (FL) che va incontro ad uno splicing corretto in quasi 100% dei casi, mentre il gene SMN2 produce solo il 10% del trascritto FL e nel 90% dei casi produce un trascritto mancante dell'esone 7 (SMN $\Delta$ 7).

L'mRNA full length dei geni SMN1 e SMN2 codifica per proteine identiche di 294 aminoacidi, mentre il trascritto mancante dell'esone 7 (isoforma SMN $\Delta$ 7) codifica per una proteina tronca di 282 aa che risulta instabile ed ha una ridotta capacità di oligomerizzazione; questo determina una minor funzionalità della proteina e una sua precoce degradazione.

Il gene SMN2 produce solo una piccola frazione di proteina SMN funzionale rispetto al suo omologo telomerico, livelli che risultano insufficienti per la normale sopravvivenza dei motoneuroni [17,18] e che costituiscono la caratteristica chiave della SMA. SMN2 è esclusivo dell'uomo: esso non è presente nemmeno negli scimpanzé che comunque presentano copie multiple di SMN [19].

Nel 1995 Lefebver et al. hanno scoperto che una mutazione omozigote della copia telomerica di SMN (SMN1) causa la SMA.

### **1.3.1 Mutazioni del gene SMN1 nei pazienti SMA**

Le mutazioni di SMN presentano caratteristiche specifiche nelle varie forme di SMA. Il 95% dei pazienti affetti da SMA I-III con mutazione di 5q-13 presenta l'assenza in omozigosi degli esoni 7 ed 8 o solo dell'esone 7 di SMN1, a causa di delezioni del gene SMN1 o di conversione genica di SMN1 in SMN2. Tra i pazienti SMA omozigoti per la delezione di SMN1, circa il 90% rivela l'assenza di entrambi gli esoni 7 ed 8, mentre solo il 10% esclusivamente dell'esone 7. La base molecolare di quest'ultimo fenomeno è da ricondurre alla conversione genica, un meccanismo di mutazione comune nella regione SMA che causa la conversione di SMN1 in SMN2 o viceversa [20]. L'assenza in omozigosi di SMN1 è invece presente solo raramente nei pazienti con SMA IV [20].

Una piccola percentuale di pazienti (5%) presenta mutazioni intrageniche di SMN1; tipicamente questi pazienti sono eterozigoti con una delezione su un cromosoma e una mutazione subdola sull'altro cromosoma. Fino ad oggi sono state identificate circa 40 mutazioni puntiformi: nonsense, frameshift ma più frequentemente mutazioni missenso che alterano la funzionalità della proteina SMN1 [2].

L'assenza in omozigosi di SMN2, un genotipo trovato nel 5-10% dei controlli, sembra non avere conseguenze cliniche. Nei pazienti SMA è però sempre presente almeno una copia del gene SMN2. La presenza di almeno un gene SMN1 funzionante è sufficiente a proteggere dalla SMA.

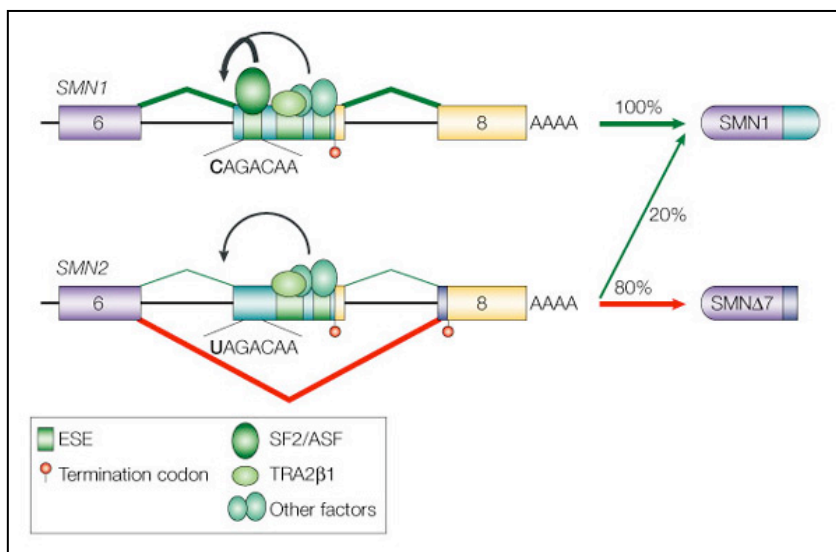
Data la natura instabile del genoma che contiene il gene SMN, i pazienti possono avere un numero variabile di copie di SMN2 (in genere tra 1 e 4), che è ciò che maggiormente influenza il fenotipo clinico. Poiché infatti ogni copia di SMN2 produce circa il 10% di trascritti FL, un aumentato numero di geni SMN2 si traduce

in una maggiore espressione di proteina SMN-FL, che è di beneficio per i pazienti. I pazienti SMA di tipo I sono omozigoti per la delezione di SMN1 ed hanno una o due copie di SMN2, producendo così circa il 10-20% del trascritto FL. I pazienti con SMA tipo II hanno tre geni SMN2 funzionanti, mentre i pazienti con SMA tipo IIIa presentano quattro copie di SMN2 e producono quindi circa il 40% di trascritto FL [21].

### 1.3.2 Lo splicing alternativo del gene SMN2

Il diverso splicing che si osserva a livello di SMN1 e SMN2 è stato spiegato da vari ricercatori secondo teorie diverse, di cui le due principali si basano sulla perdita di un enhancer o la creazione di un silencer (Figura 2).

Nel 2002, Cartegni e Kranier sostenevano l'ipotesi che la sostituzione a livello dell'esone 7 c.840C>T alterasse la sequenza di un Exonic Splicing Enhancer (ESEs), sopprimendone la funzione. L'esone 7 del gene SMN è caratterizzato da un sito di splicing 3' debole all'interno delle 54 paia di basi che lo compongono. L'inclusione dell'esone 7 nell'mRNA è regolata positivamente da molti elementi esonici in cis, chiamati splicing enhancer intronici, e negativamente da elementi in cis esonici chiamati Exonic Splicing Silencers (ESSs) oppure da silenziatori intronici (ISSs). Tutti questi elementi in cis sono riconosciuti da proteine trans-acting di splicing: proteine ricche in serina-arginina (proteine SR) e da diverse ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNPs) [22].



**Figura 2.** Lo splicing alternativo del gene SMN

Un importante ESE si trova all'estremità 5' dell'esone 7 di SMN1 ed è riconosciuto dal fattore di splicing SF2/ASF (una proteina SR) che interagisce con la classe U2 delle snRNP e con il suo fattore ausiliario U2AF. Cartegni e Krainer (2002) hanno dimostrato che questa sequenza ESE è alterata dalla sostituzione c.840C>T in SMN2, e ciò determina un mancato reclutamento del fattore di splicing SF2/ASF. Ne consegue che l'esone 7 non viene riconosciuto dagli elementi proteici che regolano lo splicing e viene generato uno splicing alternativo che taglia l'esone 7 (SMNΔ7). Specifici effettori molecolari di sintesi che mimano la funzione delle proteine SR possono quindi andare a correggere lo splicing di SMN2 [22] così come l'utilizzo di oligonucleotidi antisenso (modificati bifunzionali) che si legano al sito di legame di SF2/ASF [23].

Una seconda ipotesi è quella proposta nel 2003 da Kashima e Manley, i quali sostenevano che la sostituzione c.840C>T in SMN2 generi un ESS che legando hnRNP A1 facilita lo skipping dell'esone 7. Tale teoria è supportata dal fatto che il knockdown di hnRNP A1, determinato con l'utilizzo di siRNA (small interfering RNA), induce un aumento dell'inclusione dell'esone 7.

Questi due modelli non sono necessariamente incompatibili, infatti una terza ipotesi tende ad unificare i due meccanismi precedentemente descritti, attribuendo la facilitazione dello splicing alternativo del trascritto SMN che taglia l'esone 7 a un duplice meccanismo che comprende sia la perdita di un ESE specifico per SF2/ASF che la contemporanea creazione di un ESS specifico per hnRNP A1. È stato dimostrato, inoltre, sempre da Cartegni, che SF2/ASF e hnRNP A1 si antagonizzano tra loro con una competizione che sembra essere basata sulle loro concentrazioni relative e capacità di legame all'RNA [24]. L'espressione variabile di questi regolatori di splicing potrebbe essere responsabile della differente frazione di inclusione dell'esone 7 nei diversi tessuti e dunque contribuire all'interessamento isolato dei motoneuroni che si osserva nella SMA.

Ulteriori meccanismi agiscono sullo splicing dell'esone 7 di SMN2. In particolare, un altro ESE molto potente si trova nella regione centrale dell'esone 7. Il fattore di splicing tipo SR Htra2β1 e molte altre proteine di splicing (SRp30c, hnRNP G e RBM) riconoscono questo ESE facilitando l'inclusione dello stesso esone 7 e determinando quel 10% del trascritto FL SMN2. Infatti l'overespressione di Htra2β1 incrementa fino all'80% il livello di trascritti FL SMN2 [25].

Lo splicing silencer intronico più importante tra tutti gli splicing enhancer e silencer degli introni 6 e 7 è, invece, ISS-N1 che esercita un potente effetto sull'attività di altri elementi positivi cis dell'esone 7 e dell'introne 7. Esso è costituito da 15 paia di basi ed è localizzato a 5bp dal dominio di binding per U1 snRNP (particella ribonucleoproteica nucleare ricca in uridina, essenziale per il processo di splicing) nell'introne 7. Oligonucleotidi antisenso contro ISS-N1 determinano l'inclusione dell'esone 7 in quasi tutti gli mRNA trascritti di SMN2, come dimostrato in esperimenti sia in vitro che sulle cellule [26].

Nonostante le numerose ipotesi proposte, il meccanismo di inclusione o esclusione dell'esone 7 non è ancora stato determinato con chiarezza. Importanti passi avanti

nei possibili approcci terapeutici potranno sicuramente essere fatti con una maggiore comprensione di tale meccanismo.

### **1.4 La diagnosi genetica (molecolare) della SMA**

Tutti i pazienti che manifestano segni e sintomi suggestivi di amiotrofia muscolare spinale, dovrebbero essere sottoposti all'analisi genetica per l'individuazione della delezione omozigote del gene SMN1, test che ha una sensibilità del 95% ed una specificità di circa il 100% [27,28].

Esistono due test diagnostici differenti: un saggio di PCR associato alla digestione con enzimi di restrizione [22,29] ed un saggio di PCR allele-specifico per i prodotti dei geni SMN1 e SMN2 [30,31]. Il primo metodo si basa sulla diversa suscettibilità dei prodotti dei geni SMN1 e SMN2 alla digestione delle endonucleasi. Il saggio di PCR allele-specifico si basa invece sulla variazione nucleotidica presente a livello dell'esone 7: sono stati costruiti dei primers che amplificano in modo quantitativo SMN1 o SMN2.

Entrambi i test confermano la diagnosi di SMA 5q, ma il secondo fornisce anche una misura quantitativa del numero di copie del gene SMN1. Questo è utile in quanto permette di far diagnosi di SMA anche quando solo un gene SMN1 è deletato, mentre l'altro è mutato. Infatti nel caso in cui si riscontri una sola copia del gene SMN1, si procede ad ulteriori indagini quali il sequenziamento genico.

### **1.5 La proteina SMN**

Il gene SMN codifica per una proteina di 38 kDa costituita da 294 amminoacidi [11] che risulta essere espressa ubiquitariamente nel nostro organismo e nelle diverse specie. Infatti, questo gene risulta altamente conservato nell'evoluzione: si trova, infatti, anche nei lieviti e in molti animali invertebrati e vertebrati, indicando una funzione vitale della proteina.

I livelli maggiori di tale proteina, si ritrovano nel midollo spinale, nell'encefalo e nel muscolo [17,32]. Dal punto di vista cellulare SMN si trova sia a livello del nucleo che del citoplasma [33-37]. All'interno del nucleo si localizza in strutture puntiformi chiamate gemini (gems), spesso osservate in prossimità o addirittura sovrapposte ai corpi di Cajal [38]. I corpi di Cajal sono strutture che contengono alti livelli di fattori coinvolti nella trascrizione e nel processamento di diversi tipi di RNA nucleare.

La quantità di "gems" nelle linee cellulari o nei tessuti di pazienti affetti è inversamente correlata alla gravità della patologia: nei pazienti con SMA di tipo I le "gems" sono poche o del tutto assenti [39].

Inoltre SMN è stato ritrovato nei granuli degli assoni dei motoneuroni, dove viene trasportato rapidamente in modo bidirezionale [40,41] e nei coni di crescita dei motoneuroni e forse anche nelle strutture postsinaptiche delle giunzioni neuromuscolari nei muscoli [42].

I livelli della proteina sono regolati durante lo sviluppo: sono più elevati nelle fasi embrionali per poi diminuire nel periodo postnatale, dopo la differenziazione miogenica e neuronale.

Da un punto di vista funzionale, la proteina SMN è in grado di auto assemblarsi formando strutture multimeriche [11]. Due domini sono responsabili di questa auto-associazione: uno minore (codificato dall'esone 2b), e uno maggiore (codificato dall'esone 6) [13,35]. La capacità di omodimerizzare correla inversamente con la gravità della malattia. Infatti le mutazioni che impediscono l'autoassemblaggio e la formazione del complesso multimerico, presumibilmente espongono i monomeri di SMN mutati a una rapida degradazione cellulare ubiquitino-mediata [43]. Non sorprende che le mutazioni più frequenti di SMN1 riscontrate nei pazienti SMA si raggruppino tutte in prossimità del dominio per la self-association presente nell'esone 6.

L'interazione successiva con le Gemine 2-7 contribuisce alla formazione di un complesso multiproteico stabile. Tale complesso interagisce con numerose proteine [11], suggerendo l'ipotesi che la proteina SMN svolga molteplici funzioni, sebbene non siano ancora stati chiariti tutti i significati di questi legami.

Il complesso di SMN meglio caratterizzato è quello coinvolto nell'assemblaggio delle snRNPs [38,44-50]. Le snRNP sono di fondamentale importanza in diversi aspetti del metabolismo dell'RNA, compreso il riconoscimento di siti di splicing e la rimozione catalitica di introni dal pre-mRNA [51] la trascrizione e il metabolismo degli RNA ribosomiali. La funzione di SMN meglio conosciuta al momento è la regolazione dell'assemblaggio delle snRNPs che legano SMN a livello del suo dominio Tudor [45,52]. Le snRNPs sono composte da piccoli RNA ricchi in uridina (U1, U2, U4, U5, U11 o U12) e da un anello eptamerico di proteine Sm (proteine leganti l'RNA con una struttura tridimensionale comune e che tendono a formare anelli eptamerici o esamerici). Il complesso SMN è, invece, formato dalla proteina SMN, GEMIN 2-8, e UNR-interacting protein (UNRIP), e la reazione di assemblaggio è ATP dipendente [45-47,53-55].

L'assemblaggio delle snRNP avviene in diverse fasi. Le proteine Sm prima di tutto formano un complesso con la proteina regolatrice della conduttanza al cloro (pICln, anche detta ICLN), che si pensa eviti che le proteine SM si leghino in maniera inappropriata all'RNA [38,45-49,56,57]. Essa, infatti, si trova in un complesso detto metilsoma che è in grado di metilare le proteine Sm e trasferirle sul complesso SMN [48,57-59], il quale facilita l'assemblaggio delle stesse proteine Sm con snRNA [38,45-49,56,57,59,60,61]. Successivamente, l'ipermetilazione in 5' del cappuccio 7-metilguanosina (m7G) in trimetilguanosina (TMG) permette il trasporto del complesso SMN nel nucleo [62], dove gli snRNPs vanno incontro a un'ulteriore maturazione per lo splicing dell'mRNA [56].

Il complesso multiproteico di cui SMN fa parte, oltre ad interagire transitoriamente in modo non stechiometrico con le proteine Sm, contrae rapporti anche con altre proteine, tra cui le hsp70, p53, Bcl-2 ed alcune proteine virali. Il significato di queste interazioni è ancora in parte sconosciuto.



In realtà, si è visto che SMN interviene nell'assemblaggio di altre RNP, oltre alle snRNP, anche se esse non sono ancora state definite con chiarezza [63]. Particolarmente rilevanti sembrano essere le proteine Sm-like (LSm proteins) [58,64-68], che condividono numerose caratteristiche con le proteine Sm, essendo in grado di formare strutture ad anello eptamerico e contengono domini ricchi in arginina (domini RG) in grado di legare il dominio Tudor di SMN. Alternativamente, è stato proposto che SMN lavori in un complesso specifico degli assoni in associazione con le RNP nucleari eterogenee R e Q (hnRNPQ/R) [42,69] e con le proteine Z leganti il DNA (ZBPs) [70]. Questo complesso sembra interferire con il trasporto dell'mRNA della  $\beta$ -actina o di altri mRNA che non sono ancora stati identificati.

### **1.5.1 Il ruolo della proteina SMN nella patogenesi della SMA**

La funzione ubiquitaria della proteina SMN nella biogenesi delle snRNPs in tutti i tipi di cellule, non spiega perché un suo difetto causi specificamente una selettiva degenerazione motoneuronale.

Le ipotesi che fin ora sono state proposte per spiegare la patogenesi della SMA sono principalmente due, probabilmente correlate tra di loro.

#### **1.5.1.1 SMA come diretta conseguenza del difetto nella biogenesi delle snRNP**

La prima ipotesi si basa sull'osservazione che una diminuita espressione della proteina SMN determina un'alterazione dell'assemblaggio degli snRNPs, con una conseguente diminuzione del loro quantitativo e un'alterata attività dello spliceosoma.

Da diversi studi condotti su modelli murini si è potuto dedurre che l'assemblaggio degli snRNP vari durante lo sviluppo [71] e in relazione al grado di severità della malattia. Inoltre, in modelli embrionali di rana (*Xenopus laevis*) e di zebrafish (*Danio rerio*) ridotti livelli di SMN e di Gemina2 causano un difetto negli assoni motori [72] anche morfologico, a cui segue un deficit a livello del muscoli da essi innervati. Questi difetti venivano poi risanati con la coiniezione di snRNP purificate [73]. Gabanella ha mostrato che topi SMA (*Smn*<sup>-/-</sup>;*SMN2*<sup>+/+</sup>) presentano una diminuzione significativa dei livelli di proteina SMN e dell'attività di sintesi delle snRNP, a livello dell'encefalo e del midollo spinale, rispetto a topi controllo wild-type (*Smn*<sup>+/+</sup>;*SMN2*<sup>+/+</sup>).

Per spiegare la specificità tissutale delle alterazioni determinate dalla SMA, questa visione suggerisce che la riduzione di SMN determini una disfunzione del meccanismo di splicing di molecole di mRNA codificanti per proteine vitali motoneuronali specifiche, che ad ora non sono state ancora identificate [74].

Un'altra spiegazione proposta è che i motoneuroni, essendo cellule di grandi dimensioni ed ad alto consumo energetico, necessitano di alti livelli di SMN per il loro sviluppo e/o normale funzionamento e siano quindi particolarmente vulnerabili alla riduzione di questa proteina e alla conseguente diminuita sintesi delle snRNP. Tuttavia la mancanza nella SMA di alterazioni in altre grandi cellule ad alto

consumo energetico, come i motoneuroni corticali e i neuroni motori rende questa spiegazione questionabile.

### **1.5.1.2 SMA come conseguenza di una perdita di funzione specifica di SMN che porta ad un'alterazione del citoscheletro motoneuronale**

Questa seconda ipotesi prospetta che la specificità tissutale, osservabile nella SMA, sia determinata dal fatto che la proteina SMN abbia una ulteriore funzione che si esplica solo a livello dei motoneuroni. Studi immunocitochimici hanno localizzato SMN nei dendriti e negli assoni, suggerendo un ruolo di questa proteina nel trasporto assonale dell'RNA.

A favore di questa ipotesi inoltre è stato dimostrato che la proteina SMN è contenuta nei granuli di neuriti e nei coni di crescita degli assoni di cellule in coltura [75]; i granuli contenenti SMN mostrano movimenti rapidi e bidirezionali dipendenti da microtubuli e microfilamenti [40]. La proteina SMN inoltre interagisce con hnRNP R, una proteina che lega la regione 3' non tradotta dell'mRNA della  $\beta$ -actina [42] e questa interazione è necessaria per un efficiente trasporto dell' mRNA della  $\beta$ -actina a livello dei coni di crescita.

Motoneuroni isolati da topi transgenici SMA mostrano livelli ridotti dell'mRNA della  $\beta$ -actina e della proteina stessa negli assoni distali e nei coni di crescita dei motoneuroni. Inoltre nei topi SMA transgenici la lunghezza dei dendriti, degli assoni e la dimensione dei coni di crescita è significativamente ridotta, mentre il numero dei motoneuroni non varia significativamente rispetto ai controlli.

E' stato dimostrato, grazie a modelli cellulari neuronali in vitro, che l'mRNA della  $\beta$ -actina a livello dei coni di crescita è necessario per la crescita assonale: è il citoscheletro, costituito dalla rispettiva proteina, che fa da guida per l'allungamento e la mobilità degli assoni [40]. Per un suo corretto funzionamento, l'actina necessita del legame con delle proteine specifiche, chiamate actin-binding proteins e si è visto che la proteina SMN non mutata lega e si colocalizza, a livello dei processi neuronali, con la profilina, una actin-binding protein [76].

Ulteriori studi, effettuati sui modelli murini SMA, hanno dimostrato un coinvolgimento di SMN anche nella formazione della giunzione neuromuscolare (NMJ). Le NMJ di topi SMA mostrano difetti sia a livello pre-sinaptico, definiti come accumulo di aggregati di NF a livello delle terminazioni nervose e una povera arborizzazione, che a livello post-sinaptico, definiti come una immaturità della placca motoria. Vi è la persistenza della subunità  $\gamma$  a livello dei recettori per l'acetilcolina (AChR), subunità che normalmente entro le due settimane di vita viene sostituita da quella  $\epsilon$ .

Inoltre queste anomalie a livello delle NMJ compaiono prima di qualsiasi altra alterazione e prima della comparsa dei sintomi clinici.

Tutti questi dati sembrano fortemente indicare un ruolo critico della proteina SMN nel normale sviluppo, crescita e sopravvivenza motoneuronale.

## **1.6 I modelli animali**

Diversi modelli animali di Atrofia Muscolare Spinale sono ormai stati prodotti, ed è risultato evidente il grande contributo che essi hanno fornito nella comprensione delle caratteristiche e delle funzioni del gene *Smn*, la patogenesi e i meccanismi molecolari alla base della malattia, l'efficacia e le tossicità di nuove potenziali terapie.

Il gene *SMN2* si trova solo nell'uomo e quasi tutti gli altri organismi possiedono solo una copia del gene *SMN*. I modelli di topi, nematodi e mosche che non hanno livelli significativi di proteina *SMN* (knockdown soprattutto), hanno un fenotipo letale embrionale.

Il primo modello di SMA ottenuto è stato quello della *Drosophila*, dove nel gene *SMN* sono state identificate diverse mutazioni missenso che insorgevano spontaneamente impedendo alla proteina di autoassemblarsi [77]. Gli embrioni mutanti sopravvivono fino allo stadio larvale, ma solo grazie al contributo materno della proteina *SMN* wild-type. Prima del decesso le larve sviluppano diverse anomalie motorie dovute alla disorganizzazione della giunzione neuromuscolare e dei recettori postsinaptici. Questo fenotipo può essere migliorato se si aumenta l'espressione di *SMN* wild type sia nel nervo che nel muscolo, ma non se l'aumento avviene in uno solo di questi tessuti, suggerendo che il difetto di *SMN* determina alterazioni sia della porzione presinaptica che di quella postsinaptica della giunzione neuromuscolare.

Un modello di SMA di zebrafish *Danio rerio* è stato creato utilizzando oligonucleotidi antisense morfolino diminuendo i livelli endogeni di proteina *SMN* fino al 60% (livello che si pensa essere quello presente nei pazienti SMA). Questi pesci mostrano difetti di crescita motoneuronale assonale e di pathfinding durante lo sviluppo, senza anomalie di altri tipi cellulari neuronali o del muscolo, suggerendo che la proteina *SMN* abbia un ruolo essenziale per lo sviluppo dei motoneuroni [72].

I topi transgenici rappresentano il modello probabilmente più vicino alla patologia umana e più utile alla ricerca biologica e medica.

Per risolvere il problema della letalità embrionale dei topi *Smn* (-/-) sono state adottate due strategie.

Frugier ha creato un knockout del gene *SMN* utilizzando il sistema Cre-LoxP focalizzandosi sull'esone 7. I topi portatori dell'esone 7 affiancato dai siti LoxP sono stati incrociati con topi transgenici per la ricombinasi Cre. Per fare sì che l'esone 7 sia eliminato nei soli motoneuroni, la ricombinasi risulta espressa sotto il controllo del promoter NSE (Neuron Specific Enolasi). Circa il 25% della progenie di questo incrocio manca della FL-*SMN* nelle cellule neuronali e mostra molti dei sintomi propri dei pazienti SMA, con deterioramento motorio rapido e la morte a 4 settimane di età. Patologicamente è stata osservata un'anomala organizzazione del citoscheletro nella giunzione neuromuscolare, perdita degli assoni motori e solo una lieve riduzione dei corpi cellulari dei motoneuroni [78].

Questo riporta chiaramente l'importanza della presenza dell'esone 7 nel trascritto

SMN. I limiti associati a questo modello sono dovuti al fatto che la SMA è causata da bassi livelli costanti di FL-SMN, mentre in questo caso la deplezione di FL-SMN si ha quando si attiva il promoter. Inoltre il promoter NSE non è completamente specifico per i motoneuroni e probabilmente altre popolazioni neuronali presenteranno una diminuita produzione di FL-SMN.

La seconda strategia adottata da Monani utilizza un altro approccio che si basa sulla capacità di SMN2 di eliminare la mortalità embrionale nei topi SMN<sup>-/-</sup> e di migliorare il fenotipo in base al numero di copie. E' stato così generato il topo SMA che esprime SMN2 umano in un topo già Smn knock out [79]. Questo topo ha le caratteristiche fenotipiche della SMA e la severità della malattia dipende dal numero di copie di SMN2. In particolare i topi esprimenti una copia di SMN2 muoiono entro 12 ore dalla nascita e topi con due copie di SMN2 sopravvivono fino a 6 giorni. I topi che esprimono da 8 a 16 copie del gene SMN2 sono fenotipicamente normali. Questo gruppo ha successivamente creato una linea di topi che esprimono alti livelli di SMN $\Delta$ 7 (SMN $\Delta$ 7<sup>+/+</sup>) in topi SMN2<sup>+/+</sup>; Smn<sup>-/-</sup> [80]. L'aspettativa di vita in questi topi è di 14-15 giorni, indicando che il trascritto SMN $\Delta$ 7 potrebbe rivestire un ruolo protettivo forse interagendo con la proteina FL. L'introduzione di SMN $\Delta$ 7 migliora il fenotipo e permette quindi un monitoraggio più lungo della progressione della malattia da parte dei ricercatori.

I topi SMN2<sup>+/+</sup>; SMN $\Delta$ 7<sup>+/+</sup>; Smn<sup>-/-</sup> riproducono il fenotipo della malattia umana in quanto sviluppano una perdita progressiva delle funzioni motorie.

I modelli SMA di topo sviluppati fino ad ora hanno confermato la suscettibilità dei motoneuroni al deficit di SMN ed hanno dimostrato come la degenerazione dei motoneuroni possa essere prevenuta aumentando i livelli di SMN2. Al momento sono utilizzate linee di topi che sopravvivono per al massimo 1 o 2 settimane di età, limitando la durata dello svolgimento della terapia e della valutazione sulla sua efficacia. A causa di queste difficoltà si stanno cercando di creare topi con una malattia intermedia, più facilmente utilizzabile per i trials terapeutici pre-clinici. Inoltre si sta cercando di creare un modello di topo inducibile in cui SMN possa essere attivato durante differenti stadi dello sviluppo; in questo modo si potrebbe definire quando la terapia debba essere iniziata per avere beneficio.

### **1.7 Gli approcci terapeutici**

Allo stato attuale non esistono ancora strategie terapeutiche totalmente efficaci per la cura della SMA. Nel corso degli anni, con l'acquisizione d'informazioni più precise, anche se non del tutto chiare, circa i meccanismi patogenetici e la storia naturale della malattia, sono stati proposti diversi approcci per cercare di modificare il decorso di tale patologia. Gli studi sui modelli murini e sui pazienti affetti da SMA hanno mostrato la stretta correlazione tra questa malattia e bassi livelli di espressione del gene SMN; tutti i diversi approcci terapeutici mirano pertanto, pur perseguendo strade diverse, ad intervenire su questo punto.

I tre campi d'indagine terapeutica sono:

- terapia farmacologica;

- terapia genica: ha come cardine d'azione la sostituzione del gene SMN1 [81]. Altri approcci sperimentali mirano invece ad aumentare i livelli di proteina SMN FL, ad incrementare l'espressione di SMN2, a prevenire lo skipping dell'esone 7 e a stabilizzare la proteina SMN [81];
- terapia cellulare: mira ad incrementare la neuroprotezione dei neuroni danneggiati tramite l'incremento di frazioni cellulari non neuronali (astrociti, microglia), la produzione di fattori trofici, e la sostituzione di cellule neuronali precocemente degenerate.

### 1.7.1 Terapia farmacologica

La terapia farmacologica ad oggi propone diverse tipologie di composti con potenziale efficacia per la SMA. La molteplicità di farmaci disponibili possono essere raccolti, per maggior chiarezza e maneggevolezza, rispetto al meccanismo cellulare su cui vanno ad agire.

- **Aumento dei livelli di proteina SMN-FL.** Maggiori livelli di proteina SMN-FL possono essere ottenuti tramite due differenti approcci: 1) l'aumento di espressione del gene SMN2 (attivazione); 2) attraverso la prevenzione dello skipping dell'esone 7. Una classe di farmaci studiata per la sua abilità di attivare il gene SMN2 è quella degli inibitori degli istoni deacetilasi (HDACS), essendo il controllo dello stato di acetilazione degli istoni un importante meccanismo epigenetico per la regolazione dell'espressione genica. Sono, quindi, stati studiati il sodio butirato, il fenilbutirato e l'acido valproico. Questi composti non hanno però mostrato di migliorare in misura significativa la sintomatologia della malattia [82,83]. Un altro composto appartenente alla classe degli inibitori degli HDAC è la Tricostatina A, derivato dell'acido idrossamico, in grado di attivare l'espressione del gene SMN2 in vivo con un effetto di miglioramento sul fenotipo SMA [84]. Promettenti sembrano anche gli inibitori HDAC individuati più di recente, come LBH589 [85] e SAHA [86].

Recentemente sono stati studiati alcuni derivati del quinazoline in grado di attraversare la barriera ematoencefalica e capaci di aumentare i trascritti di SMN-FL e la proteina, sia nelle linee cellulari di fibroblasti dei pazienti sia in modelli murini SMN $\Delta$ 7 [87-89]. Un altro meccanismo che permette l'incremento della proteina SMN-FL è la prevenzione dello skipping dell'esone 7, promuovendone l'inclusione nel trascritto del gene SMN2. Lo splicing di SMN2 può essere corretto tramite l'utilizzo di piccole molecole di sintesi che, legandosi all'esone 7, mimano la funzione delle proteine SR [22] o con degli oligonucleotidi antisense bifunzionali, complementari all'esone 7, che contengono sequenze con funzione di enhancer che reclutano fattori positivi trans-acting [90]. Oligonucleotidi antisense complementari all'esone 7 possono inibirne lo skipping anche grazie al fatto che impediscono il legame di fattori negativi di splicing come per esempio hnRNP A1 [91]. Tutti questi studi sono stati effettuati in vitro e si è quindi ancora molto lontani da un possibile approccio sull'uomo. Grzeschik et al. hanno notato che l'idrossiurea, un inibitore della ribonucleotide reductasi già usato per trattare i pazienti con anemia mediterranea e talassemia, aumenta il rapporto mRNA SMN-

FL/ SMN $\Delta$ 7 [92]. Data la facile somministrazione (orale), la sicurezza e l'alta biodisponibilità, sono stati iniziati diversi trial clinici per valutare l'efficacia dell'idrossiurea in pazienti SMA.

- **Stabilizzazione della proteina SMN $\Delta$ 7.** La proteina SMN $\Delta$ 7 è un prodotto proteico del gene SMN2, instabile ma parzialmente funzionante. È stato osservato che la quantità residua di SMN2 nei modelli murini e nei pazienti SMA correla inversamente con il grado di malattia. Farmaci come gli aminoglicosidi tobramicina, amikacina e il più recente G418 possono stabilizzare l'isoforma SMN $\Delta$ 7 allungandone la catena aminoacidica a livello C-terminale [93,94]. Ne risulta così una proteina più stabile, con una corretta localizzazione citoplasmatica ed una maggiore capacità di oligomerizzazione. Il maggior ostacolo all'impiego degli aminoglicosidi è la loro bassa capacità di penetrazione attraverso la barriera emato-encefalica, che non ha impedito però il raggiungimento di risultati promettenti [95].

- **Agenti neuroprotettori.** Essendo la SMA una malattia neurodegenerativa, sono stati effettuati studi e sperimentazioni anche nel campo della neuroprotezione, al fine di prevenire la patogenica perdita neuronale. Attingendo dalle terapie già in studio per la Sclerosi Laterale Amiotrofica (SLA), è stato condotto uno studio di sperimentazione del Riluzolo in un modello murino di SMA. Bloccando il rilascio presinaptico di glutammato, il Riluzolo diminuisce l'eccitotossicità neuronale. Nei topi SMA il Riluzolo aumenta la sopravvivenza ma non migliora la funzione muscolare. A livello microscopico previene un'aberrante organizzazione del citoscheletro a livello degli assoni terminali, ma non previene la perdita degli assoni a livello prossimale [96]. Sono da poco stati conclusi due trial clinici che testavano l'efficacia del farmaco, ma si è ancora in attesa dei risultati definitivi.

Anche il Gabapentin, analogo strutturale del neurotrasmettitore acido  $\gamma$ -aminobutirrico che ne modula la neurotrasmissione riducendo la sintesi di glutammato, è stato sottoposto a trial clinico, senza però mostrare alcuna efficacia significativa nei pazienti SMA [97]. Sono, infine, state studiate anche altre vie di somministrazione dei fattori neuroprotettivi, una delle quali si basa sull'utilizzo di un vettore adenovirale che contiene il gene della Cardiotrophin-1 (CT-1), un fattore neurotrofico. L'iniezione intramuscolare del vettore con la CT-1 in topi SMA, ne ha migliorato la sopravvivenza ed ha ritardato l'insorgenza dei difetti a livello dei motoneuroni [98].

Attualmente è in corso la fase III di un trial clinico sui pazienti SMA con olesoxime (TROPHOS), molecola che agisce sui pori di permeabilità della membrana dei mitocondri. Questa molecola sembra aver già dato buoni risultati in studi clinici su pazienti SLA [99], poiché sembra agire come efficace neuroprotettore.

Un ulteriore trial clinico in corso sui pazienti SMA è quello con salbutamolo, in quanto è stato osservato che questo agonista dei recettori adrenergici  $\beta$ 2 determina un incremento significativo dei livelli dell'mRNA di SMN2-full length e della proteina SMN nei fibroblasti (promuovendo l'inclusione dell'esone 7 in SMN2) [100].

## 1.7.2 Terapia cellulare

Il trapianto di cellule staminali neurali (NSC) può essere una potenziale strategia terapeutica per le malattie neurodegenerative tra cui la SMA attraverso molteplici meccanismi tra i quali: 1) la sostituzione neuronale associata al rilascio di fattori neuroprotettivi prodotti dalle staminali [101]; 2) la riduzione di sostanze tossiche nel microambiente [102]; 3) la sostituzione di altre cellule non-neuronali [103]. E' stato dimostrato, sia dal nostro gruppo che da altri, che il trapianto di NSC può migliorare il fenotipo delle malattie del motoneurone in modelli animali di SMA [104-109]. Abbiamo precedentemente descritto l'efficacia del trapianto delle NSC derivate dal midollo spinale nel migliorare il fenotipo del modello murino di SMA SMN-Delta7 [106]. I topi SMA trattati hanno dimostrato un miglioramento delle funzioni motorie, un aumento della durata di vita e un miglioramento della patologia dell'unità motoria rispetto ai topi non trattati. Questi dati hanno dimostrato per la prima volta che il trapianto di NSC influenza positivamente il fenotipo SMA dimostrandosi, quindi, una potenziale strategia terapeutica per la SMA [106]. In un successivo studio abbiamo verificato se le NSC derivate da cellule staminali pluripotenti murine potessero modificare il fenotipo della SMA in un modello murino affetto da tale patologia e abbiamo osservato che, dopo il trapianto nel topo malato, le cellule NSC erano in grado di migrare nel parenchima generando motoneuroni e di migliorare il fenotipo e la sopravvivenza grazie al loro effetto neuroprotettivo [108].

Le cellule staminali embrionali umane (hES) o le recenti cellule staminali pluripotenti indotte (iPS) possono, quindi, rappresentare una potenziale sorgente cellulare per una strategia cellulo-mediata anche in una patologia come la SMA. I dati ottenuti con le cellule selezionabili indicano inoltre che il differenziamento in motoneuroni potrebbe essere ottimizzato partendo da NSC fenotipicamente stabili. La combinazione del trapianto cellulare con il trattamento farmacologico o la terapia genica potrebbero aumentare l'efficacia della terapia.

### 1.7.2.1 Le cellule staminali pluripotenti indotte (iPS)

Le cellule staminali sono cellule che hanno sia la capacità di autorinnovarsi che di generare molteplici tipi cellulari maturi. Per essere definita staminale una cellula deve soddisfare due proprietà principali: l'auto-rinnovamento, cioè la capacità di compiere un numero "illimitato" di cicli replicativi mantenendo il medesimo stato indifferenziato, e la capacità di dare origine a una o più tipi cellulari differenziati [110].

Esistono diversi tipi di cellule staminali, che in ordine di potenziale differenziativo possono essere suddivisi in totipotenti, pluripotenti e multipotenti. Le cellule totipotenti sono in grado di differenziarsi in qualsiasi tipo cellulare; devono essere prelevate nelle prime fasi di sviluppo dell'organismo, dallo zigote fino alla blastocisti. Le cellule pluripotenti possono specializzarsi in tutti i tipi di cellule che troviamo in un individuo adulto ma non in cellule che compongono i tessuti extra-embryonari. Devono essere prelevate dalla Inner Cell Mass della blastocisti

[111,112]. Le cellule multipotenti sono specifiche di ciascun tessuto, dando origine ad un numero limitato di tipi cellulari.

Grazie alla loro capacità differenziativa, le cellule staminali pluripotenti embrionali (ES) da decenni sono oggetto dell'attenzione investigativa dei ricercatori. Le cellule ES proliferano indefinitamente in vitro mantenendo comunque la capacità di differenziarsi in tutti i tipi di cellule somatiche. Sono state isolate per la prima volta nel 1981 [111]. Possono essere mantenute in coltura con LIF (leukemia inhibitory factor) su un feeder layer di fibroblasti embrionali [113-115]. In assenza di LIF o rimuovendo il feeder layer, le cellule ES si differenziano spontaneamente in aggregati multicellulari, detti corpi embrionali [112].

Nell'ambito della ricerca sulle cellule staminali embrionali sono stati sviluppati diversi protocolli di differenziamento in vitro, col fine di ottenere specifici sottotipi cellulari neuronali e gliali. L'esposizione all'acido retinoico (RA) e al Sonic hedgehog (Shh) indirizza le cellule ES verso un fenotipo motoneuronale [116], mentre altre molecole possono portare al differenziamento in neuroni dopaminergici [117,118], neuroni telencefalici [119], astrociti [120], oligodendrociti [121,122] e microglia [123].

Le cellule staminali embrionali possono essere impiegate anche a scopo terapeutico per curare patologie neurodegenerative o in altri settori della medicina [112]. L'utilizzo di queste cellule però è complicato a causa dei problemi di rigetto che esse possono indurre in quanto eterologhe, e a causa di problematiche etiche. Nell'ottica di superare questi ostacoli, un' importante scoperta degli ultimi anni è stata, quindi, quella delle cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) [124]. Queste cellule sono generate riprogrammando cellule somatiche adulte a uno stato di pluripotenza, attraverso l'espressione di fattori di trascrizione. Le iPSC possiedono tutte le caratteristiche delle ES: esprimono gli stessi marcatori di staminalità; mantengono le potenzialità di self-renewal, hanno la proprietà di differenziare nei tre foglietti embrionali, hanno un cariotipo normale e possono formare teratomi se trapiantate in organismi immunodeficienti.

Per ottenere le cellule iPS sono stati studiati i possibili fattori responsabili della staminalità e i metodi per poterli trasferire direttamente nelle cellule riceventi [124].

I principali fattori individuati in grado di indurre una riprogrammazione in senso pluripotente sono:

- Oct4 [125,126], il cui livello di espressione si è visto influenzare molto il destino delle cellule embrionali;
- Sox2 [127-129], la cui presenza è indispensabile per il mantenimento della pluripotenza nelle cellule ES [130-132];
- Nanog [133,134], la cui assenza determina il differenziamento delle cellule embrionali [131,135], e la sua espressione genica è regolata da Sox2 e Oct4 [136,137], con i quali condivide anche molti target genici [138,139];
- c-Myc [140], possiede numerosi target genici e sembra in grado di modificare la struttura della cromatina [141] e di attivare l'espressione di alcuni miRNA [142];



- Klf4 [143], uno dei suoi target è p21, la cui assenza determina una proliferazione cellulare per l'azione di Klf4 su p53, e coopera inoltre con Oct3/4 e Sox2 nell'attivazione di Lefty1 core promoter [144].

- Lin28 [124,145], blocca il processo di differenziamento mediato dai miRNA. Il suo locus è stato identificato come sito di legame per Oct3/4, Sox2 e Nanog [146].

Takahashi e Yamanaka sono stati i primi ad usare questi fattori per la riprogrammazione di fibroblasti cutanei. In particolare Sox2, Oct3/4, c-Myc e Klf4 sono stati trasfettati con un trasportatore retrovirale resistente alla neomicina (con cui le cellule venivano, quindi, poi selezionate) [147,148]. Dopo la trasfezione queste cellule mostravano caratteristiche genetiche e morfologiche simili alle ES ed erano inoltre in grado di formare teratomi, provando così la loro pluripotenza. Questa tecnica è stata approfondita nel tempo da studi successivi, volti soprattutto a definire quali fattori siano più efficienti nell'indurre la riprogrammazione [124,149-151]. Recentemente Yu et al., hanno descritto la generazione di cellule iPS sempre tramite la trasfezione di fattori di riprogrammazione, ma senza la necessità di vettori virali, diminuendo quindi le modificazioni indotte alle cellule riceventi e rendendo queste cellule ancora più simili a cellule fisiologiche. Questo risultato è stato ottenuto tramite la trasfezione (nucleofezione) di sei fattori di riprogrammazione (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, and KLF4) veicolati tramite vettori oriP/EBNA1 che venivano successivamente persi con la sospensione della selezione farmacologica [152].

La pluripotenza delle cellule iPS le rende un'abbondante e importante fonte per la generazione di cellule specifiche che non possono essere prelevate dai pazienti mediante biopsia. Nella SMA il danno si concentra quasi esclusivamente a livello dei motoneuroni, cellule che sono difficilmente isolabili nell'uomo. Ebert et. al., (2009) hanno descritto per la prima volta la generazione di iPSC da fibroblasti cutanei di un paziente SMA e la conseguente generazione di motoneuroni. Le cellule risultanti mostravano i difetti specifici della malattia e reagivano positivamente alla terapia sperimentale con agenti incrementanti livello di proteina SMN [153].

Le cellule iPS sembrano quindi aprire nuove strade in quanto permettono lo studio dei meccanismi patogenetici, lo screening di molecole farmacologiche e possono essere una fonte alternativa ed abbondante per le strategie terapeutiche cellulo-mediate.

### **1.7.3 Terapia genica**

Partendo dall'osservazione che, sia in modelli murini che in tessuti umani di pazienti affetti da atrofia muscolare spinale, quanto maggiore è la quantità di SMN2 residua più lieve è la malattia sviluppata, sono stati proposti diversi modelli di terapia genica volti alla introduzione del gene SMN e quindi alla sua espressione. Primi tentativi in questa direzione furono condotti da Azzouz et al., i quali dimostrarono che vettori lentivirali esprimenti il gene SMN umano erano in grado di incrementare i livelli della proteina SMN in fibroblasti con fenotipo SMA I e

in motoneuroni di topi SMA [154]. Questi risultati si sono mostrati comunque limitati in termini di miglioramento fenotipico.

Il gruppo di Passini ha dimostrato come l'iniezione intratecale in topi SMA di SMN umano coniugato con vettore virale adeno-associato (AVV) sia in grado di aumentare la sopravvivenza da 15 a 50 giorni, estendibile fino a 153 giorni con l'impiego di vettore AVV auto-complementare. Inoltre, con tale metodica si ottiene anche un miglioramento fenotipico sia a livello motoneuronale che muscolare [155].

Recentemente, il gruppo di Kaspar in collaborazione Burghes, ha proposto un nuovo approccio genetico come terapia della SMA estremamente promettente. Partendo dall'osservazione che un vettore auto-complementare associato all'Adenovirus 9 (scAAV-9) era in grado di attraversare la barriera ematoencefalica dopo iniezione per via sistemica [156], è stata testata l'iniezione di tale vettore contenente il gene SMN1 nella vena facciale di topi SMA a 1 giorno dalla nascita. Ne è risultata un'aumentata sopravvivenza a 250 giorni, una trasduzione del 40% dei motoneuroni ed una funzione neuromuscolare quasi nella norma, anche da un punto di vista elettromiografico. Permanevano comunque dimensioni molto ridotte nei topi SMA trattati rispetto ai controlli sani [157]. Un risultato più fine probabilmente richiederà una conoscenza di quando e/o dove, elevati livelli di SMN siano necessari in vivo.

Anche se molto promettente, la terapia genica può essere limitata dall'aumentata risposta immunologica ed espressione transiente delle strutture geniche. Inoltre non sono ancora del tutto risolti i dubbi sulla sicurezza del trattamento con vettori virali in vivo.

La correzione genica mirata (TGC), un approccio molecolare volto a produrre cambiamenti puntiformi nella DNA all'interno di un cromosoma, può essere applicata come strategia terapeutica alternativa nella SMA. Siccome la conversione genica è condotta nel contesto del gene intatto, essa non sarà transitoria, ma permanente ed ereditabile. Negli studi pubblicati la correzione genica mirata è stata applicata al DNA per convertire la timina in citosina nella posizione +6 dell'esone 7 nel gene SMN2, la zona critica per l'inclusione dell'esone 7. Il gene risultante, che assomigliava a SMN1, veniva trascritto per produrre mRNA full-length, per poi conseguentemente dare origine alla proteina funzionale localizzata adeguatamente [158].

Questo approccio, anche se necessita di ulteriori approfondimenti, potrebbe dare origine ad una nuova strategia terapeutica per la SMA.

#### **1.7.3.1 Correzione genica mirata (TGC)**

La correzione genica mirata (TGC, targeted gene correction) è una strategia molecolare volta a correggere mutazioni puntiformi che causano malattie genetiche [159]. Il metodo prevede l'uso degli oligodesossiribonucleotidi (ODN) a filamento singolo per dirigere una reazione di scambio nucleotidico nella zona di mutazione, correggendo così il genotipo delle cellule umane.

Nonostante molteplici studi dedicati all'argomento, il preciso meccanismo molecolare con il quale avviene la correzione genica mirata non è ancora del tutto

chiarito. Gli ODN sono in grado di localizzare la zona target all'interno di un cromosoma e di ibridarsi alla sequenza DNA complementare. Se l'ODN contiene una singola base non complementare alla sequenza target si crea un disaccoppiamento (mismatch). Tale distorsione dell'elica viene riconosciuta dagli enzimi catalizzanti gli scambi nucleotidici, il disaccoppiamento viene eliminato mediante l'inserzione della giusta base complementare, e la continuità dell'elica viene ripristinata. Sono note molte delle vie biochimiche e molecolari necessarie per questi scambi nucleotidici. Esse includono l'appaiamento del DNA, l'allineamento omologo, l'escissione e l'inserimento delle basi. La reazione dipende dall'attività combinata di questi enzimi indotta dall'appaiamento dell'ODN con il filamento target dell'elica.

La replicazione del DNA gioca un ruolo cruciale nel processo di correzione genica mirata. Infatti, è necessario che la struttura nucleosomica venga destabilizzata, aumentando così l'accessibilità della zona target. Durante la correzione l'ODN viene incorporato nell'elica vicino alla forca replicativa come un "pseudoframmento di Okazaki" e dona il gruppo 3'-OH funzionale per l'estensione della replicazione, passando così direttamente nell'elica. Numerosi studi indicano la fase S del ciclo cellulare come il periodo nel quale il processo di correzione genica accade con più facilità, confermando così l'ipotesi descritta.

Dobbiamo aggiungere che il processo di correzione mirata è stato descritto anche durante la fase di trascrizione. Il ruolo preciso della trascrizione nel TGC è stato dibattuto da diversi studiosi, la maggior parte dei quali comunque lo considera puramente supplementare a quello di replicazione [159].

### **1.7.3.2 Possibili campi di applicazione della TGC**

Le strategie di riparazione genica presentano vantaggi significativi in termini di efficacia e sicurezza rispetto alla classica terapia genica con DNA complementare (cDNA) [160], inoltre l'approccio mirato permette di estendere la correzione terapeutica alle malattie ereditarie sia recessive sia dominanti [161]. Il gene corretto rimane sotto il controllo stretto delle sue fisiologiche sequenze regolatorie, garantendo un livello e una durata della sua espressione appropriata e specifica [162]. La correzione del gene è stabile, non dipende dalle dimensioni del gene stesso e il rischio connesso con eventuali mutazioni inserzionali risulta ridotto. Da ultimo possiamo notare che gli ODN brevi (sODN) sono spesso sufficienti come sequenze-donatrici e hanno più probabilità di passare nel nucleo rispetto ai grandi DNA plasmidici usati nell'approccio del trasferimento genico [163].

La strategia di correzione delle mutazioni genetiche all'interno di un cromosoma rappresenta l'idea centrale di una nuova direzione nella medicina molecolare. La metodica della correzione genica mirata è stata applicata recentemente nella ricerca per diverse malattie ereditarie, tra le quali la talassemia [164], la distrofia muscolare di Duchenne [165] e l'atrofia muscolare spinale [158]. Inoltre molteplici studi sono stati dedicati alla conferma dell'efficacia della TGC in diverse tipologie di cellule, per esempio nei melanociti albinici [166], nelle cellule della retina [167] o negli epatociti in vitro e in vivo [168]. Negli ultimi decenni sono state inoltre sviluppate diverse metodiche di riparazione genica, che usavano frammenti di

DNA a singolo [123,169] o doppio filamento [170-172], piccoli oligonucleotidi a filamento singolo [173-175], chimere RNA-DNA [176-178] e oligonucleotidi formanti elica tripla [179,180]. Come per i DNA plasmidici, questi elementi nucleici volti alla riparazione genica possono essere introdotti nella cellula con l'utilizzo di metodi non virali [181].

Importante per le applicazioni terapeutiche future è l'efficienza della tecnica della TGC, che dipende da molteplici fattori. È stato osservato che diversi reagenti usati per la lipofezione possono influenzare il risultato dell'operazione. Sono state inoltre notate variazioni nelle linee clonali anche quando lo stesso ODN è stato usato per promuovere la correzione genica. La gerarchia dei livelli di correzione quando diverse basi vengono corrette suggerisce che il meccanismo del TGC, dipendendo dalla replicazione del DNA, ha un'efficacia diversa su diversi difetti da correggere [182].

Sono state proposte molteplici strategie volte a migliorare il risultato quantitativo della tecnica del TGC. Come dimostrato, il più significativo per la frequenza della correzione è il prolungamento artificiale della fase S del ciclo cellulare, che aumenta l'accessibilità della zona target. Purtroppo questo metodo è difficilmente utilizzabile nell'uomo. Il livello di replicazione o divisione cellulare nella maggior parte dei tessuti target in vivo è abbastanza basso. Quindi, anche se gli studi dei meccanismi biomolecolari hanno aiutato i ricercatori a individuare elementi e processi che regolano il TGC, l'applicazione dei risultati costituisce un elemento interessante.

Ci sono diversi possibili approcci a questo problema. Basandosi sul fatto che l'attività trascrizionale possa aumentare l'efficienza della correzione genica mirata si potrebbero trattare i modelli animali o i pazienti con reagenti che aumentino l'attività trascrizionale con inibitori degli istoni deacetilasi. L'aumento generale dei livelli di espressione genica potrebbe quindi promuovere cambiamenti strutturali dinamici nella cromatina aumentando l'accessibilità della zona target. Anche se molto interessante, tale approccio ha importanti svantaggi dal punto di vista della tossicità.

Il secondo approccio potrebbe sfruttare le strategie di somministrazione del farmaco che inducono un modesto danno tissutale, stimolando i meccanismi di riparazione, aumentando i livelli di replicazione del DNA e la divisione cellulare. Tale meccanismo comunque ha i suoi limiti ed è applicabile solo in certe malattie.

Un'alternativa interessante può essere considerata nella terapia "ex vivo", l'approccio in cui le cellule vengono prelevate dall'organismo, corrette in vitro con gli ODN e fatte espandere in coltura. Il successivo trapianto delle cellule espanse potrebbe produrre risultati clinici positivi. La correzione genica mirata e le terapie ad essa connesse potrebbero trovare una loro applicazione nelle diverse malattie genetiche che non hanno per il momento terapie efficaci [183].

## 2. OBIETTIVI DELLO STUDIO

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una delle più comuni malattie neurologiche ereditabili e delle principali cause di mortalità infantile. Sebbene i modelli animali siano molto utili per lo studio della patogenesi e per lo screening farmacologico, presentano importanti limitazioni nel ricapitolare la malattia. La riprogrammazione di cellule umane adulte in cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC) potrebbe rappresentare uno strumento utile poiché permette l'ottenimento di cellule paziente specifiche utilizzabili come modello di malattia, come sorgente cellulare per strategie cellulo-mediate e per lo studio di terapie geniche.

Questo progetto di ricerca è stato realizzato attraverso le seguenti fasi:

- **Generazione di cellule iPS.** Abbiamo ottenuto le iPSC da fibroblasti di un paziente SMA I e dal padre portatore sano utilizzando vettori episomali non-integranti. La pluripotenzialità delle cellule è stata confermata dalle analisi morfologiche, immunocitochimiche e genetiche.
- **Correzione genica.** Abbiamo corretto le iPSC-SMA tramite un oligonucleotide a singolo filamento che permette la conversione del gene SMN2 in SMN1.
- **Differenziamento delle iPSC-WT, delle iPSC-SMA e delle iPSC trattate (iPSC-TR) in motoneuroni.** Dato che le iPSC rappresentano una promettente fonte cellulare sia per lo studio patogenetico delle malattie motoneuronali, che per lo sviluppo di strategie di trapianto abbiamo generato motoneuroni (MN) dalle iPSC-SMA, iPSC-TR e iPSC-WT utilizzando un protocollo di differenziamento precedentemente sviluppato per le hES.
- **Trapianto di MN-WT, MN-SMA e MN-TR in un modello murino di SMA.** Abbiamo determinato se i motoneuroni derivati dalle iPSC potessero integrarsi e sopravvivere nel midollo spinale di un modello murino di SMA, l'effetto dell'ambiente malato sulle cellule trapiantate e vice-versa, e infine se il trapianto potesse migliorare il fenotipo della malattia

### 3. MATERIALI E METODI

#### 3.1 *Produzione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)*

Per la riprogrammazione di fibroblasti cutanei umani abbiamo co-trasfettato, tramite nucleofezione (NHDF - VPD-1001 con programma U-20, Amaxa, Walkersville, MD), vettori episomali oriP/EBNA1 contenenti sei fattori di riprogrammazione (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, e KLF4) precedentemente descritti [152]. I fibroblasti trasfettati ( $\sim 1.0 \times 10^6$  cellule per nucleofezione) sono stati seminati in piastre 3×10-cm rivestite di Matrigel (BD Bioscience) con terreno per colture di fibroblasti, cambiato ogni due giorni.

Dopo 4 giorni dalla trasfezione il medium di coltura è stato sostituito con terreno per hESC (mTeSR, Stem Cell Inc.) per 8-10 giorni. Le colonie con morfologia simile a quella delle cellule iPS sono diventate visibili 18 giorni dopo la trasfezione. Per visualizzare la presenza di colonie di iPS umane, una delle 3 piastre da 10 cm è stata marcata con fosfatasi alcalina (Cat# SCR004, Millipore, Billerica, MA) tra il giorno 18 e il giorno 20 dopo la trasfezione. Le cellule rimanenti sono state tripsinizzate tra i giorni 25 e 30 e ripiastrate in piastre fresche di 10 cm trattate con Matrigel in rapporto 1:3. Le colonie di iPS con morfologia simile a quella delle hES sono state isolate per l'espansione e l'analisi.

##### 3.1.1 Cariotipo e DNA fingerprinting

È stata eseguita l'analisi cromosomica standard G-banding. Come conferma del fatto che i cloni di cellule iPS derivavano dai fibroblasti cutanei appartenenti ai soggetti in studio, è stata eseguita l'analisi delle brevi ripetizioni in tandem (STR).

##### 3.1.2 PCR dei vettori episomali

La purificazione del DNA episomale delle cellule iPS è stata eseguita tramite QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) e la digestione con Proteinasi K (NEB, Ipswich, MA). Il DNA genomico è stato isolato usando il metodo di estrazione tradizionale con fenolo/cloroformio. Il DNA genomico e il DNA episomale dei fibroblasti non trasfettati è stato usato come controllo negativo, mentre quello dei fibroblasti cutanei trasfettati con i vettori episomali (17 giorni dopo la trasfezione) è stato usato come controllo positivo. Per la reazione di PCR è stato utilizzato  $\sim 0.1 \mu\text{g}$  di DNA genomico o di DNA episomale estratto da  $1 \times 10^4$  cellule. Le sequenze dei primer utilizzati e i protocolli di PCR sono stati pubblicate precedentemente [152].

##### 3.1.3 Generazione di Embryoid Bodies e formazione di teratomi

Per testare la capacità delle iPSC ottenute di differenziare in tutti e tre i foglietti embrionali abbiamo verificato, in vitro, la formazione di Embryoid Bodies (EB) e in vivo la formazione di teratomi come descritto [184].

In questo ultimo caso le cellule, raccolte mediante collagenasi, sono state iniettate nei muscoli delle zampe posteriori di topi immunodeficienti di 6 settimane (circa

una piastra da 10 cm con confluenza di 50-80% per topo) (Charles River Laboratory, Wilmington, MA). Dopo 5-10 settimane, i teratomi sono stati isolati, fissati in paraformaldeide al 4%, inclusi in paraffina e processati con una colorazione ematossilina-eosina.

### **3.1.4 Immunoistochimica delle iPSC e dei loro derivati**

Le cellule sono state fissate in paraformaldeide al 4% per 10 minuti, in seguito permeabilizzate con 0.5% Tween-20 in PBS e esposte a 0.1% Tween-20 con 10% di siero di cavallo. Le cellule sono state poi incubate con anticorpi primari overnight e con anticorpi secondari per 1 ora (Alexa Fluors, Invitrogen). Gli anticorpi primari utilizzati sono i seguenti: SSEA-3 (1:100, R&D), SSEA-4 (1:500, DSHB), TRA1-60 (1:500, Chemicon), TRA1-81 (1:500, Chemicon), NANOG (1:500 Abcam), alfa-fetoproteina (AFP) (1:500, DAKO), alfa-actinina (1:500 Sigma), alfa actina del muscolo liscio (1:500, Sigma), Desmina (1:100, Novocastra), TuJ1 (1:1000, Sigma) e GFAP (1:1000, DAKO; 1:500, Sigma). L'acquisizione delle immagini è stata eseguita con microscopio confocale Leica LCS2.

## **3.2 Correzione delle iPSC-SMA**

Un totale di 500.000 cellule sono state trasfettate con uno specifico oligonucleotide (ODN) 75-T, avente come target il filamento trascritto (T) del DNA. L'ODN utilizzato è stato disegnato in modo da permettere il cambio di una base, dalla timina alla citosina (DiMatteo D. et al., 2008). Tutti gli ODN sono stati prodotti da Sigma-Genosys.

Per la trasfezione è stata utilizzata una mix contenente l'ODN (3, 6, 10 e 20 µg) e il jetPrime (Poly-plus Transfection, Inc., San Marcos, CA). La miscela è stata aggiunta direttamente in piastra e lasciata overnight. Successivamente le cellule sono state prelevate a tempi diversi (24, 48 e 72 ore, 7 giorni) per permettere l'analisi del DNA e delle proteine. Come controllo in tutti gli esperimenti è stato usato un ODN scrambled.

Per ottenere i cloni dopo 24 ore dalla trasfezione (con 10 µg di ODN) le cellule sono state prelevate e piastrate alla densità clonale (1 cellula/pozzetto in una well da 96 pozzetti). I cloni ottenuti sono stati testati tramite PCR per confermare la correzione della mutazione.

### **3.2.1 Purificazione degli acidi nucleici**

Il DNA è stato purificato utilizzando un kit Qiagen (Valencia, CA). Le concentrazioni sono state misurate mediante spettrofotometro Nanodrop (Wilmington, DE). Abbiamo utilizzato solo i campioni con rapporto tra 1,8 e 2,0.

### **3.2.2 Digestione con enzimi di restrizione**

Il DNA dei campioni in esame è stato amplificato tramite PCR come descritto [185] e successivamente è stato digerito con l'enzima Dra1 overnight. Dopo la digestione la mix è stata caricata sul gel di agarosio al 4% e l'elettroforesi è stata

eseguita a 100 V per 2 ore. La banda di SMN1 risulta quella più alta di 190 bp, mentre per SMN2 si ottengono due bande una di 175 e una di 15 bp.

### 3.2.3 Sequenziamento del DNA

Come ulteriore conferma dell'avvenuta correzione il prodotto della digestione è stato trattato con ExoSAP e sequenziato direttamente mediante protocollo Big Dye terminator 3.1 sul ABI 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Per il sequenziamento ciclico sono state utilizzate reazioni separate per i primer forward e reverse.

### 3.2.4 Western Blot

Le cellule sono state raccolte e centrifugate, mentre i tessuti sono stati congelati in azoto liquido. Il pellet di cellule e i tessuti sono stati lisati a freddo per 10 minuti nel buffer con 20 mM Tris-HCl (pH 7.5), 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 10% glicerolo, 1% Triton X-100, 100 mM NaF, e 2.5 mM di pirofosfato di sodio con aggiunta di protease inhibitor cocktail e phosphatase inhibitor cocktail (Pierce, Rockford, IL). Il lisato è stato purificato mediante centrifugazione a 13,500 rpm per 20 minuti a 4°C. La concentrazione proteica è stata determinata mediante BCA assay con uso di BSA standard (Pierce, Rockford, IL). Venti microgrammi di proteina sono stati separati tramite 12% SDS-PAGE e poi trasportati mediante elettroforesi all'interno delle membrane di nitrocellulosa. È stata eseguita una prima incubazione con anticorpi monoclonali umani anti-SMN (1:15,000, aminoacidi 14–174, BD Transduction Laboratories; BD Biosciences, San Jose, CA) e anti- $\alpha$ -actina (1:250, Sigma), e successivamente è stato utilizzato un anticorpo secondario coniugato con perossidasi (Molecular Probes/Invitrogen). Le proteine sono state visualizzate mediante reagenti chemiluminescenti (Amersham, Piscataway, NJ). L'analisi densitometrica è stata eseguita con Image J software e i risultati sono stati analizzati con ANOVA e metodo Tukey's post-hoc.

### 3.2.5 Immunofluorescenza e quantificazione dei gems

Le cellule sono state piastrate in chamber da 4 pozzetti lavate con PBS e poi fissate per 20 minuti con paraformaldeide al 4%. Dopo un lavaggio in PBS le cellule sono state permeabilizzate con Triton X-100 allo 0.1% per 5 minuti e poi trattate per 30 minuti con siero di capra a 10% (Zymed, South San Francisco, CA). Le cellule sono state incubate con anticorpo monoclonale anti-SMN specifico per gli aminoacidi 14–174 con BSA al 3% per 1 ora (1:500, BD Transduction Laboratories; BD Biosciences, San Jose, CA). In seguito sono state lavate 4 volte con PBS–0.1% Triton X-100 e poi incubate per 1 ora con l'anticorpo secondario coniugato ai marcatori Alexa Fluor (Molecular Probes/Invitrogen). Dopo altri 4 lavaggi con PBS–Triton X-100 le cellule sono state marcate con DAPI (Molecular Probes/Invitrogen). Le immagini sono state acquisite con microscopio confocale SP2 AOBs.

Il numero di "gems" è stato determinato seguendo il protocollo precedentemente descritto [186]. Abbiamo calcolato il numero di "gems" per 100 nuclei e la



percentuale di cellule con nuclei nei quali i “gems” erano presenti. Tra i nuclei con i “gems” abbiamo calcolato anche la quantità di “gems” per nucleo. Queste osservazioni sono state eseguite sia sulle cellule trattate e sia su quelle non trattate. L’analisi dei dati è stata eseguita con ANOVA e metodo di Tukey's post-hoc. Il risultato veniva considerato significativo con i valori di *P* meno o uguale a 0,05.

### **3.3 Differenziamento di cellule iPS in motoneuroni e successiva caratterizzazione**

Abbiamo generato motoneuroni (MN) spinali seguendo un protocollo multi-fasico utilizzato per le cellule hES [187]. Per la produzione dei motoneuroni le cellule iPS ottenute da fibroblasti SMA (iPSC-SMA), le iPS corrette con ODN (iPSC-TR) e quelle ottenute dai fibroblasti del padre portatore sano (iPSC-WT) sono state piastrate in un terreno neuronale che consisteva in DMEM/F12 (Gibco, Invitrogen), aminoacidi non essenziali MEM, N2 e eparina (2 µg/ml; Sigma-Aldrich). Dopo 10 giorni è stato aggiunto l’acido retinoico (AR) (0.1 µM, Sigma-Aldrich) per la caudalizzazione neurale. Una settimana dopo (al giorno 17), sono state isolate le cellule neuroectodermiche posteriorizzate. Questi cluster neuroepiteliali sono stati risospesi nello stesso terreno neuronale in presenza di AR (0.1 µM) e Sonic hedgehog (SHH) (100–200 ng/ml; R&D Systems Inc.) per una settimana. In seguito, (giorno 24), sono stati aggiunti i fattori di crescita brain-derived neurotrophic factor (BDNF), glial-derived neurotrophic factor (GDNF), e insulin-like growth factor-1 (IGF1) (10 ng/ml; Peprotech).

#### **3.3.1 Purificazione dei motoneuroni**

Per la purificazione dei MN derivati dalle cellule iPS, abbiamo utilizzato il metodo descritto da Wada et al. [188] con qualche modifica. I motoneuroni sono stati dissociati enzimaticamente tramite Accutase, lavati con N2B27, e successivamente risospesi in 3 ml di DMEM/F12 contenente 0.004% Dnase1 (Sigma Aldrich). Il reagente, Biocoll (Biochrom AG, Germany), è stato diluito a 1:1.76 con L15 medium (Gibco) e 4 ml sono stati posti in una provetta conica da 15 ml (BD-Falcon). La sospensione cellulare è stata posta delicatamente sul gradiente del reagente. Dopo la centrifugazione di 5,006 g per 20 minuti a 4°C, le cellule all’interfaccia tra i gradienti sono state raccolte e piastrate in terreno motoneuronale. Dopo la coltura overnight, le cellule sono state fissate e preparate per l’analisi immunocitochimica per quantificare i motoneuroni.

#### **3.3.2 Analisi fenotipica dei motoneuroni**

Il fenotipo dei MN ottenuti è stato analizzato mediante immunocitochimica come descritto precedentemente [106,107,153]. Sono stati usati i seguenti anticorpi: Pax6 (1:200, Millipore), nestina (1:200, Millipore), Sox1 (R&D, 1:1000), TuJ1 (1:200, Millipore), GFAP (1:300, SIGMA), Olig2, (1: 500, Santa Cruz), Islet1/2 (1:200, Millipore), HB9 (1:200 Millipore), ChAT (1:200, Millipore), MAP2 (mouse monoclonal, 1:100; Sigma–Aldrich) e SMI-32 (Covance, 1:500). Per valutare la

formazione *in vitro* delle giunzioni neuromuscolari abbiamo utilizzato una coltura con motoneuroni e miotubi in terreno differenziativo (Promocell). I recettori acetilcolinici sono stati visualizzati mediante marcatura con  $\alpha$ -bungarotossina (Molecular Probes, 1:500). I neuroni sono stati contati e misurati come descritto in precedenza [105] e successivamente analizzati mediante NIH Image Software. I calcoli statistici sono stati eseguiti utilizzando software StatsDirect.

### 3.4 Modelli Animali

Come modello murino di SMA sono stati utilizzati i topi FVB.Cg-Tg(SMN2delta7)4299Ahmb Tg(SMN2)89Ahmb Smn1tm1Msd/J [80]. I topi omozigoti sono tripli mutanti che contengono due alleli transgenici e una singola mutazione target. L'allele 4299Ahmb di Tg (SMN2delta7) consiste in un cDNA di SMN che difetta dell'esone 7, mentre l'allele 89Ahmb di Tg (SMN2) consiste dell'intero gene SMN2 umano. I topi eterozigoti Smn knockout e con il transgene SMN2 sono stati incrociati per ottenere topi omozigoti knockout per gli alleli Smn (Topi SMA, SMN2+/+;Smn $\Delta$ 7+/+;mSmn-/-) (linea 4299; FVB.Cg-Tg(SMN2\*delta7)4299Ahmb Tg(SMN2)89Ahmb Smn1tm1Msd). I topi sono stati genotipati tramite PCR su DNA genomico ottenuto dalla biopsia della coda, come precedentemente descritto [189]. Tutti i topi transgenici sono stati ottenuti dal laboratorio della Jackson. Gli esperimenti in vivo sono stati approvati dal comitato etico dell'Università degli Studi di Milano e del Ministero della Salute, in accordo con le linee guida del US National Institutes of Health [183].

### 3.5 Trapianto di motoneuroni derivati dalle iPSC in topi SMA

I MN sono stati isolati tramite una centrifugazione a gradiente come descritto sopra. La trasfezione con GFP è stata eseguita utilizzando la Turbo GFP (Sigma). I fibroblasti umani sono stati usati come controllo e raccolti tramite tripsina.

I MN derivati dalle iPSC sono stati utilizzati per il trapianto nel midollo spinale di un topo SMA di un giorno di vita (10,000 cellule/1  $\mu$ l  $\times$  due iniezioni, in totale: 20,000 per l'iniezione cervicale C4–C5; e in totale: 20,000 per l'iniezione lombare L1/L2) tramite iniezione diretta come descritto [190,191].

I topi sono stati divisi in 4 gruppi sperimentali: il gruppo 1 ha ricevuto MN-WT; il gruppo 2 ha ricevuto MN-SMA; il gruppo 3 ha ricevuto MN-TR, quindi geneticamente corretti; e il gruppo 4 ha ricevuto solo il veicolo. Come controllo addizionale un quinto gruppo ha ricevuto fibroblasti umani. Ogni gruppo aveva lo stesso numero di maschi e femmine. L'immunosoppressore FK506 è stato somministrato con un'iniezione intraperitoneale ad una concentrazione di 1.0 mg/kg, ed è stato somministrato a tutti gli animali per l'intera durata dell'esperimento. Gli animali sono stati monitorati fino allo stadio finale della malattia, analizzando la funzione neuromuscolare, la sopravvivenza e il fenotipo delle cellule umane trapiantate. Un'altra serie di topi (SMA e WT trattati e non) sono stati analizzati per la quantificazione istologica (per ogni gruppo n=6, a 13 giorni).

### 3.5.1 Analisi della sopravvivenza

I topi SMA trapiantati e non sono stati seguiti giornalmente per individuare i sintomi della malattia. I topi sono stati sacrificati all'endpoint clinico, momento in cui mostravano problemi nel nutrimento (topi con 30% di riduzione del peso e grave paralisi) e difficoltà respiratorie, come precedentemente descritto [183]. Il peso è stato monitorato giornalmente.

### 3.5.2 Analisi della forza dei topi SMA

E' stata determinata la forza di grip come precedentemente descritto [152,183]. I topi WT, trattati e non trattati sono stati valutati per determinare quanto a lungo fossero in grado di sostenere il loro peso tenendosi ad una barra di metallo sospesa a mezz'aria (tra il 10° e il 15° giorno di età). Ogni topo è stato sottoposto a 3 ripetizioni con un periodo di riposo di 10 minuti tra un test e l'altro. I dati sono stati analizzati con ANOVA seguita da un'analisi Tukey's posthoc per un confronto multiplo.

### 3.5.3 Analisi dell'attività locomotoria spontanea

La funzione locomotoria è stata analizzata tramite open-field test [152,183]. L'apparato consiste in una scatola di legno (28 x 28 x 5 cm) la cui base è suddivisa in 16 quadrati uguali di 7 x 7 cm. I topi vengono posizionati al centro dell'open-field e osservati individualmente. Ad ogni topo è permesso di camminare liberamente per 5 minuti, durante i quali il numero dei quadrati attraversati vengono contati. I dati vengono annotati manualmente.

### 3.5.4 Analisi dei tessuti

Gli animali sono stati sacrificati allo stadio finale della malattia perfusi e fissati con paraformaldeide al 4%. Il midollo spinale è stato isolato e immerso in paraformaldeide per 4 ore, poi in saccarosio al 20% overnight e infine congelato con azoto liquido. I tessuti sono stati crio-sezionati. Tutte le sezioni sono state incubate con l'1% di FCS in PBS e trattate con 0.25% di Triton X-100. Le sezioni sono state analizzate con diversi marker per determinare il fenotipo delle cellule trapiantate GFP positive. Gli anticorpi primari sono stati incubati a 4°C overnight per: TuJ1 (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon), NeuN (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon), SMI32 (1: 200 Covance), MAP2 (mouse monoclonal, 1:200; Sigma), ChAT (rabbit polyclonal; 1:100 Chemicon), marker degli oligodendrociti O4 (mouse monoclonal, 1:200; Chemicon), e proteina gliofibrillare acida (GFAP) (mouse monoclonal, 1:200; Sigma). Anticorpi mouse e rabbit coniugati con RPE, CY3 o biotina (1:200; Jackson ImmunoResearch e Dako) sono stati utilizzati come anticorpi secondari quando quelli primari non erano coniugati, e sono stati incubati per 1 ora a temperature ambiente. La densità cellulare è stata quantificata con il metodo del dissettore ottico come riportato in precedenza [183]. La densità cellulare è stata quantificata dividendo il numero totale di cellule esogene con il volume totale del dissettore ottico. Il volume totale del tessuto (V-cord) è stato calcolato con il metodo Cavalieri [183]. Questo volume totale del tessuto

moltiplicato per il numero di cellule esogene per  $\mu\text{m}^3$  (Nv), produce il numero di cellule donatrici ( $n = Nv \times V\text{-cord}$ ).

### **3.5.5 Analisi istologica e conta dei motoneuroni**

Il midollo spinale lombare è stato incluso in paraffina. Sono state fatte sezioni in serie di midollo spinale lombare (12  $\mu\text{m}$  di spessore), e tra queste 1 ogni 5 è stata processata e trattata con colorazione di Nissl [152]. In queste sezioni è stato analizzato il numero e la dimensione di tutti i MN ( $n = 50$  per ogni topo). Le sezioni sono state analizzate con un ingrandimento x200 nelle corna anteriori (destra e sinistra) per individuare la presenza dei neuroni. All'interno delle corna ventrali, sotto una linea orizzontale tracciata dal canale centrale, tutte le cellule sono state quantificate. Tutte le cellule neuronali con almeno un nucleolo all'interno del nucleo sono state contate, come riportato in precedenza [152].

### **3.5.6 Analisi istologica dei muscoli**

Il muscolo distale delle zampe posteriori è stato dissezionato e congelato in azoto liquido. Le sezioni (10  $\mu\text{m}$ ) sono state montate e marcate con H&E (50 sezioni/animale). Per l'area del tibiale anteriore (TA), per il numero totale di miofibre e per il diametro delle miofibre, le immagini digitali sono state ottenute con microscopio Zeiss Axioscope e analizzate con il software NIH ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

## **3.6 Co-coltura tra motoneuroni primari derivati da topi SMA e motoneuroni umani**

Abbiamo ottenuto colture di MN primari da topi SMA e WT al giorno embrionale 12.5 (E12.5) come precedentemente riportato [183].

Il terreno di coltura utilizzato era un terreno motoneuronale con aggiunta di un cocktail di fattori trofici. Abbiamo eseguito la co-coltura separando i MN primari dai MN umani tramite una membrana microporosa, come precedentemente descritto [152,183].

### **3.6.1 Misurazione della lunghezza e della crescita assonale**

L'analisi della crescita assonale è stata eseguita come riportato in precedenza [152,183]. I MN della co-coltura sono stati fissati con paraformaldeide e successivamente con acetone. Gli anticorpi primari sono stati incubati overnight (4°C): anticorpo rabbit contro la phospho-tau (1 mg/ml; Sigma), anticorpo contro i neurofilamenti (1:500; Abcam), SMI32 (1:200 Covance), e anticorpo mouse monoclonal contro MAP2 (1:1000; Chemicon).

Le cellule sono state poi lavate e incubate per 1 ora a temperatura ambiente con un anticorpo secondario coniugato (1:200; Dako). I MN sono stati poi analizzati come precedentemente descritto [152,183]. Per la valutazione della protezione dei hMN dagli effetti neurotossici della microglia attivata, la microglia è stata ottenuta come descritto in precedenza [192] e messa in coltura, il terreno condizionato è stato raccolto dopo 24 ore sia dalla microglia di controllo sia dalla microglia attivata

con 100 ng/ml di lipopolisaccaridi (LPS, Sigma). Il terreno condizionato è stato poi filtrato e usato per il test di sopravvivenza neuronale in presenza di hMN.

### **3.6.2 Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)**

La secrezione di NT3, NT4, VEGF, NGF, CNTF, BDNF, GDNF e TGF- $\alpha$  da parte dei MN è stata determinata tramite ELISA seguendo il protocollo fornito (R&D Systems). Il terreno è stato aggiunto alle colture ( $1.5 \times 10^5$  cells, 1.5 ml) e 24 ore dopo è stato rimosso per eseguire il test ELISA (12 esperimenti indipendenti per ogni citochina).

Dopo il trapianto, le stesse citochine sono state studiate nel tratto lombare del midollo spinale (n=6 per ogni condizione) tramite ELISA. I dati sono stati analizzati usando il t-test di Student.

### **3.6.3 Anticorpi neutralizzanti**

L'incubazione dei motoneuroni murini (mMN) primari in co-coltura con i hMN è stata eseguita usando anticorpi neutralizzanti contro NT3, NT4, VEGF, NGF, CNTF, BDNF, GDNF e TGF- $\alpha$  seguendo le istruzioni fornite dalla ditta (tutti comprati da R&D ad eccezione di BDNF, comprato da Abcam).

## **3.7 Analisi statistica**

Per il confronto della sopravvivenza è stata utilizzata l'analisi Kaplan-Meier e il log-rank test. La curva di crescita, l'analisi della forza e l'open-field test sono stati analizzati tramite ANOVA e un'analisi Tukey's post-hoc. Il numero e la dimensione dei MN, dei muscoli e delle giunzioni neuromuscolari sono stati analizzati tramite ANOVA e un'analisi Tukey's post-hoc. Per l'analisi delle citochine e delle colture abbiamo utilizzato lo Student t-test. Per tutte le analisi è stato utilizzato StatsDirect per Windows (version 2.6.4) e l'ipotesi nulla è stata fissata al livello 0.05.

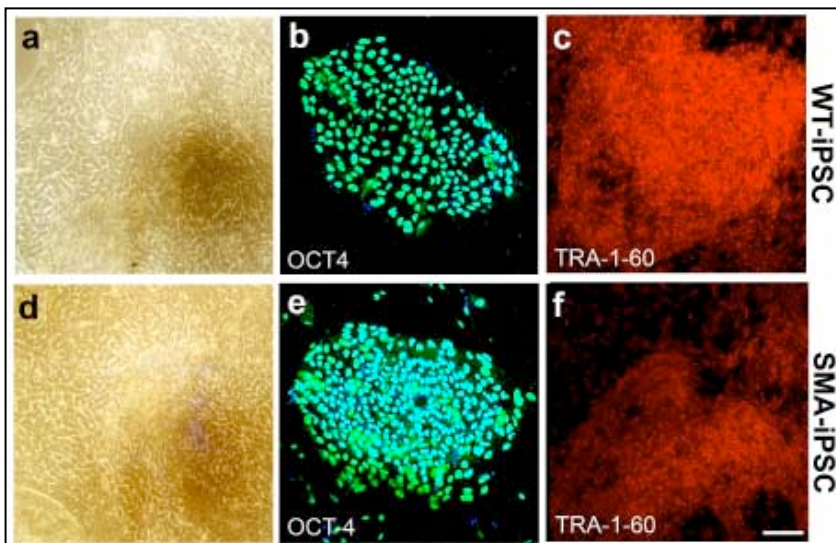
## 4. RISULTATI

### 4.1 Produzione non-virale e caratterizzazione di cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC)

Abbiamo generato cellule staminali pluripotenti indotte (iPSC), libere da vettori e sequenze transgeniche, partendo da fibroblasti primari di un paziente SMA I e dal padre portatore sano usando un metodo non virale come descritto da Yu et al. [152].

Abbiamo eseguito la nucleofezione con sei fattori di riprogrammazione (OCT4, SOX2, NANOG, LIN28, c-Myc, e KLF4) clonati in un vettore oriP/EBNA1 (Figura 4 a,b). Questi plasmidi possono essere trasfettati senza la necessità di un packaging virale e si può procedere in un secondo tempo alla coltura in assenza di farmaci selettivi permettendo la generazione di cellule iPS libere da vettori e da sequenze transgeniche. Abbiamo usato due combinazioni di plasmidi: 19 e 6 [152]. Le colonie ottenute sono state espansive su piastre rivestite con matrigel in terreno per cellule staminali umane (mTeSR).

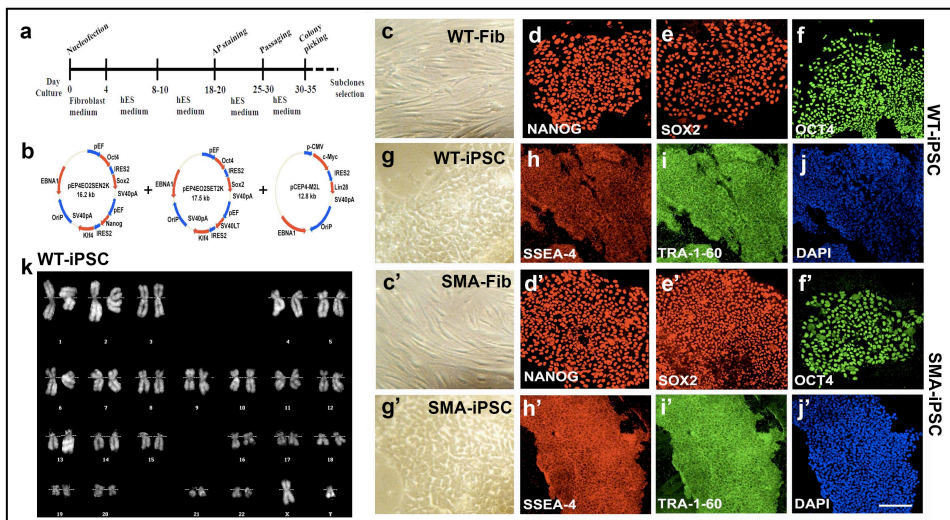
Le colonie delle cellule iPS possedevano una morfologia tipica delle cellule embrionali umane (hES) (formavano colonie compatte con un elevato rapporto nucleo-citoplasma e nucleoli prominenti) (Figura 3 a,d) ed esibivano marcatori di pluripotenza come OCT4 (Figura 3 b,e), Nanog, SSEA1, SSEA-3, TRA-1-60 (Figura 3 c,f) e TRA-1-81.

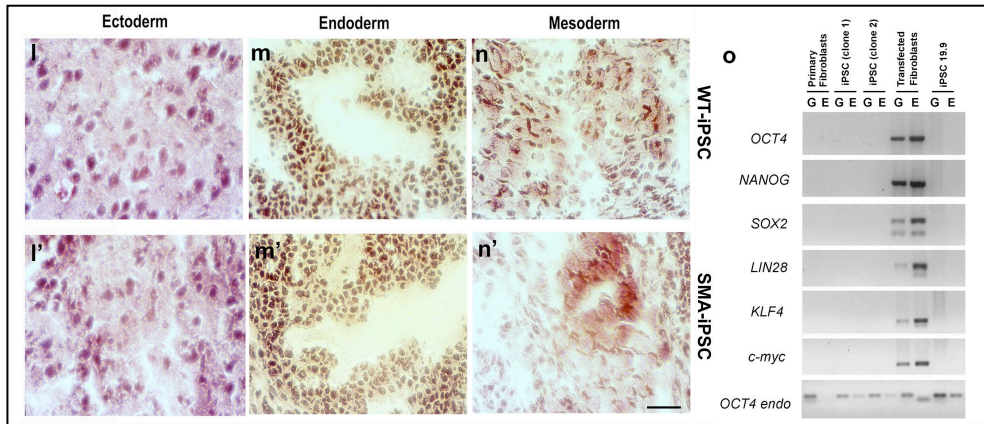


**Figura 3.** Cellule iPS ottenute tramite trasfezione con vettori episomali da fibroblasti di un paziente SMA I e dal padre portatore sano (a,d), queste cellule esprimono fattori trascrizionali e marker tipici delle cellule staminali come OCT4 (b,e) e TRA1-60 (c,f). Scale bar: 100  $\mu$ m

Nel momento in cui è stata tolta la selezione farmacologica, i vettori episomali oriP/EBNA1 sono stati gradualmente persi dalle cellule; abbiamo effettuato un subclonaggio per selezionare cloni di cellule iPS che avessero perso spontaneamente i vettori episomali e fossero liberi dalle sequenze esogene. Abbiamo poi scelto un clone di cellule iPS prodotte con la combinazione 6 e un altro con la combinazione 19 sia del paziente SMA (iPSC-SMA-6-3; iPSC-SMA-19-7), sia del padre portatore sano (iPSC-WT-6-2; iPSC-WT-19-4), e successivamente abbiamo isolato 12 subcloni da ciascuno. Abbiamo dimostrato che circa un terzo dei subcloni avevano perso i loro vettori episomali (Figura 4 o), confermando i dati descritti in letteratura [152]. Solo i cloni 19.7.3 (iPSC-SMA; Figura 4 c'-j') e 19.4.4 (iPSC-WT; Figura 4 c-j) sono stati scelti per analisi più dettagliate. L'analisi PCR ha dimostrato l'assenza di vettori e sequenze transgeniche sia nella frazione genomica che in quella episomale di questi subcloni (Figura 4 o).

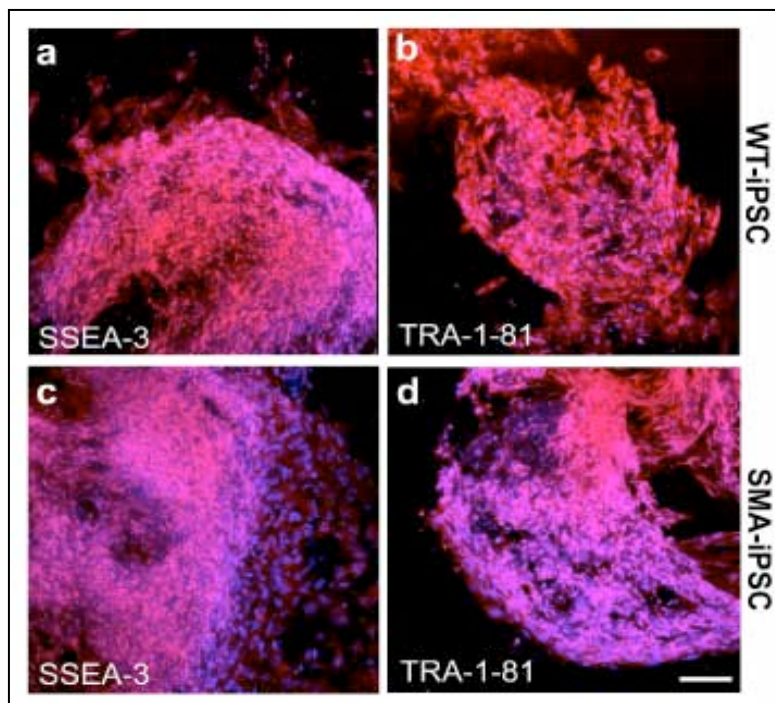
I subcloni di cellule iPS erano morfologicamente simili alle cellule hES (Figura 4 c-j; c'-j'); possedevano un cariotipo normale (Figura 4 k) ed esprimevano fattori di trascrizione e marcatori di superficie (Figura 5) specifici per cellule hES. Inoltre le cellule erano in grado di differenziarsi nei derivati dei tre foglietti embrionali in vitro (Figura 4 j-n, j'-n') e in teratomi in vivo (Figura 6). Il DNA fingerprinting ha poi confermato la loro origine dai fibroblasti cutanei.



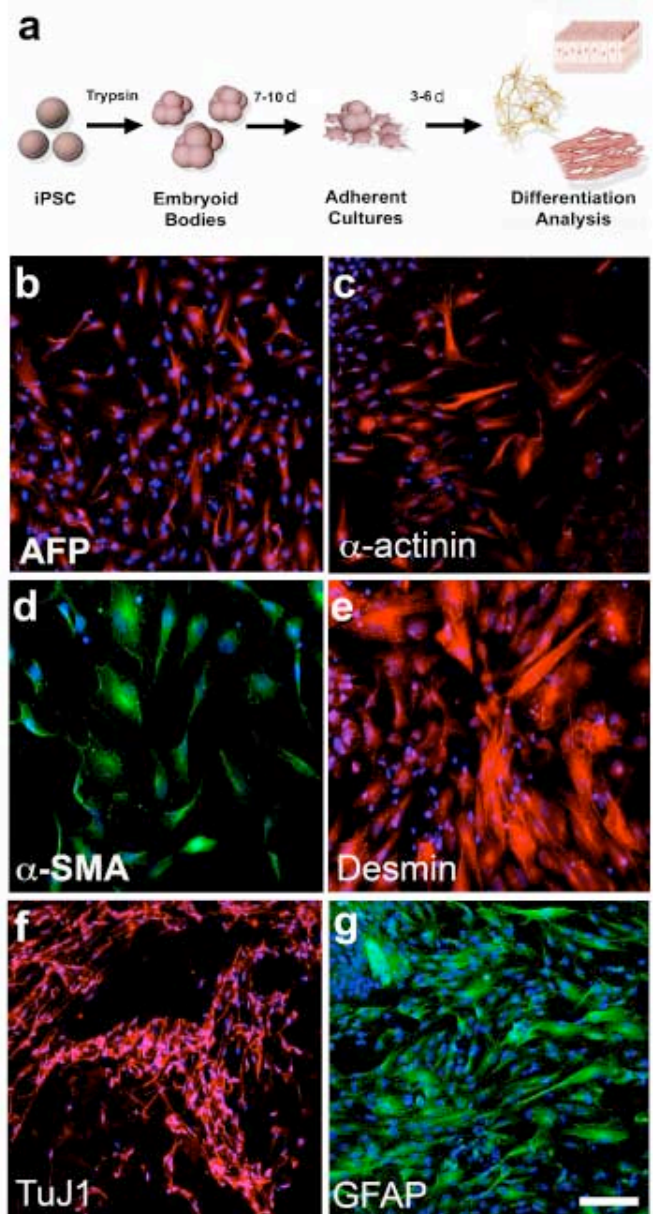


**Figura 4.** Rappresentazione schematica del protocollo di riprogrammazione non-virale per i fibroblasti e seguente selezione dei cloni (a); mappa del vettore episomale (combinazione 19) (b); pEF: eukaryotic elongation factor 1a promoter, pCMV: cytomegalovirus promoter; i transgeni e altri aspetti del vettore sono indicati con frecce rosse e blu rispettivamente. Cloni iPSC SMA (d'-j') e iPSC del padre eterozigote portatore sano (d-j); fibroblasti SMA (c'), fibroblasti controllo (c) e iPSC ottenute tramite trasfezione delle combinazione 19 di vettori episomali (g-g'). Queste cellule esprimono fattori trascrizionali come Nanog, SOX2 e OCT4 (d-f e d'-f') e marker di superficie come SSEA4, TRA1-60 (h-j e h'-j'). Il cariotipo risulta normale come mostrato in figura (k) (WT-iPSC). I cloni iPSC SMA (l'-n') e le iPSC WT (l-n) in vivo formano teratomi che contengono i tre foglietti embrionali, come mostrato nella figura con colorazione ematossilina e eosina. Analisi PCR del DNA episomale in cloni iPS (o). Il DNA genomico (G) e episomale (E) dei fibroblasti non trasfettati e trasfettati con vettori episomali è stato usato come controllo negativo (-) e positivo (+), rispettivamente. Nessuna integrazione plasmidica è stata osservata nelle iPSC. Scale bar: 100  $\mu$ m (c-j e c'-j'); 150  $\mu$ m (l-n e l'-n')





**Figura 5.** I subcloni di cellule iPS esprimono marcatori di superficie specifici per cellule embrionali staminali umane come SSEA3 (a,c) e TRA1-60 8 (b,d). Scale bar: 100  $\mu$ m

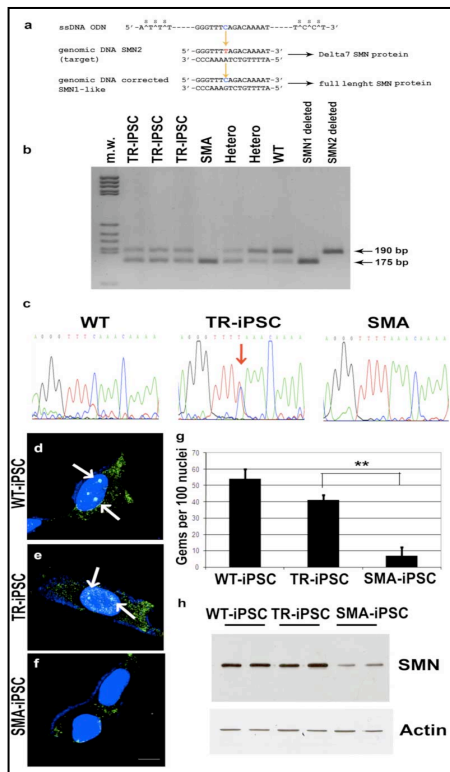


**Figura 6.** Le iPSC paziente-specifiche sono pluripotenti e possono differenziare nei tre strati germinali. Illustrazione schematica del differenziamento spontaneo delle iPSC in embryoid bodies (EBs) e successiva coltura in aderenza. Gli EBs

contengono cellule caratteristiche di ogni strato germinale: endoderma (AFP, b), mesoderma (actinina, c; actina del muscolo liscio, d; e desmina, e), endoderma (TuJ1 e GFAP, g). Scale bar: 100  $\mu$ m

## 4.2 Conversione genica di SMN2 in SMN1 mediante ODN

Precedenti lavori hanno descritto la possibilità di un cambiamento sito-specifico di una singola base nel genoma di mammifero mediante l'utilizzo di un oligonucleotide di DNA a singolo filamento (ODN) [183]. Questi ODN specifici ibridizzano alla sequenza target e agiscono come stampo per permettere la correzione nucleotidica. Basandoci su questa strategia abbiamo utilizzato un ODN specifico per SMN2 che favorisce lo scambio di una T con una C nella posizione +6 dell'esone 7, convertendo così SMN2 in SMN1 nelle cellule iPS-SMA trattate. Abbiamo utilizzato un ODN di 75 basi di lunghezza disegnato in modo da legarsi al filamento trascritto (T) del gene SMN2, come precedentemente descritto [158]. L'ODN è disegnato in modo da allinearsi perfettamente alla zona target, ad eccezione di un singolo mismatch (T/G) nel centro della sequenza SMN2 (Figura 7).



**Figura 7.** *Conversione genica nelle iPSC-SMA del gene SMN2 nel gene SMN1 tramite l'utilizzo di un oligonucleotide. Sequenza target del gene SMN2 e dell'oligonucleotide (ODN). Le basi indicate dal simbolo ^ nella sequenza dell'ODN indicano il legame del fosforotioato che protegge l'ODN dalla degradazione. Le basi blue nell'ODN sono quelle che lo dirigono alle basi rosse (target) presenti nella sequenza del gene SMN2 (a). La digestione enzimatica e il sequenziamento confermano la conversione del gene SMN2 nel gene SMN1 nelle iPSC-SMA (b,c). Analisi e quantificazione dei gems (d-g). L'analisi western blot mostra che le cellule trattate con ODN presentano alti livelli della proteina SMN rispetto alle cellule non trattate*

Tale mismatch agisce da segnale per la riparazione genica, favorendo lo scambio della base T con una C, un secondo evento ripartivo sul mismatch A/C converte A in G, risultando nella coppia corretta C–G nella zona target.

L'efficienza della trasfezione è stata ottimizzata mediante l'utilizzo di un ODN fluorescente utilizzando diverse concentrazioni (3, 6, 10, e 20  $\mu\text{g}/5 \times 10^5$  cellule), inoltre un ODN "scrambled" è stato utilizzato come controllo in tutti esperimenti. L'efficienza di trasfezione in tutte le condizioni era superiore al 70%. Con la dose di 10  $\mu\text{g}/5 \times 10^5$  cellule si è ottenuto il più alto livello di conversione con il più basso livello di tossicità.

Abbiamo successivamente confermato la conversione nucleotidica delle cellule iPS trattate tramite l'analisi della sequenza, la digestione enzimatica e l'analisi immunocitochimica (colorazione specifica per proteina SMN e analisi dei gems).

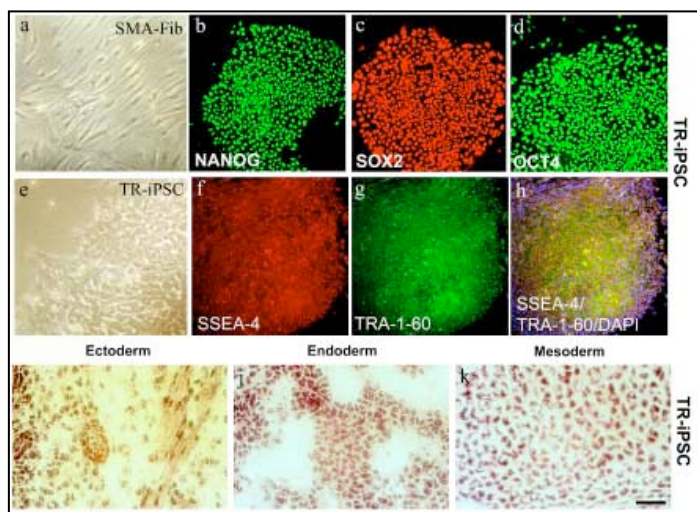
La proteina SMN risultava localizzata sia nel citoplasma che negli aggregati nucleari detti "gems". Come descritto in letteratura, la quantità di gems correla inversamente con la severità della malattia [17].

Complessivamente questi dati confermano che la quantità di proteina SMN era aumentata dopo il trattamento con l'ODN sequenza-specifico e che la proteina prodotta dal gene SMN2 corretto era funzionale nell'assemblaggio dei gems.

Per dimostrare che la correzione era permanente e che i cambiamenti nella sequenza genomica erano ereditabili, abbiamo eseguito un clonaggio delle cellule trasfettate. Abbiamo così generato una popolazione cellulare omogenea utile per studi futuri. Dopo la trasfezione con l'ODN abbiamo raccolto e piastrato le cellule a densità clonale (1 cellula/pozzetto nelle piastre da 96 pozzetti). Successivamente i cloni sono stati analizzati per accertare la presenza della conversione genica con PCR. Usando il sequenziamento diretto e l'analisi di restrizione dei polimorfismi allele-specifici (Figura 7), abbiamo analizzato i cloni trattati rispetto alle cellule iPS-SMA non trattate e alle iPS-WT. Le cellule iPS non trattate, o trattate con sequenza scramble, risultavano avere una delezione in omozigosi del gene SMN1, mentre nei cloni trattati con l'ODN si evidenziava la correzione del 50% del genotipo SMN2 in SMN1. Abbiamo analizzato 47 cloni e ne abbiamo selezionati tre che mostravano la correzione di SMN del 50%. Il genotipo corretto risultava stabile durante i seguenti passaggi in coltura, indicando che la sequenza genomica

aveva subito un cambiamento permanente ed ereditabile. Un solo clone iPSC (19.7.3.1) trattato è stato usato per gli studi successivi.

Le cellule mantenevano la pluripotenza dopo la correzione come dimostrato dalla capacità di differenziare nei tre foglietti germinativi sia *in vitro* che *in vivo* (Figura 8).



**Figura 8.** Cloni iPSC-SMA corretti con ODN. Fibroblasti SMA (a), cloni iPSC dopo la conversione genica (e). Queste cellule esprimono fattori di staminalità come Nanog, SOX2 e OCT4 (b-d), ed anche marker di superficie specifici (SSEA4, TRA1-60; f-h). iPSC-TR sono pluripotenti come dimostrato dalla formazione di teratoma *in vivo*. Il teratoma contiene i tre strati germinali come mostrato tramite la colorazione con ematossilina e eosina (j-k). Scale bar: a-h, 100  $\mu$ m; i-k, 150  $\mu$ m

Abbiamo successivamente valutato il numero di gems per nucleo nelle cellule derivate dalle iPS-SMA, iPS-TR e iPS-WT e misurato la quantità della proteina mediante western blot. Abbiamo osservato un aumento significativo del numero di gems, simile a quello delle cellule derivate dal padre eterozigote, mentre nelle cellule SMA non trattate i gems erano assenti (SMA vs TR  $P < 0.00001$ ). La successiva valutazione del livello di espressione di SMN mediante western blot ha confermato che nelle cellule iPS trattate il livello di proteina SMN era significativamente più alto rispetto a quello delle cellule iPS non trattate, raggiungendo livelli simili alle iPS-WT.

Complessivamente questi dati dimostrano che gli ODN possono indurre un cambiamento genetico diretto, permanente ed ereditabile in cellule umane malate.

### 4.3 Generazione di motoneuroni spinali da cellule iPS trattate e non, loro differenziamento, caratterizzazione e purificazione

Dato che l'isolamento dei motoneuroni (MN) spinali direttamente da tessuti umani è difficilmente perseguibile, le cellule iPS rappresentano una sorgente alternativa promettente sia per lo studio dei MN specifici di una malattia, sia per lo sviluppo di una possibile strategia di trapianto cellulare. Abbiamo pertanto deciso di valutare se le cellule iPS da noi generate potessero differenziare in motoneuroni. Il nostro scopo è stato quello di studiare l'effetto della mancanza di SMN1 sui motoneuroni e di capire se la correzione genica potesse migliorarne il fenotipo.

#### 4.3.1 Generazione di motoneuroni spinali

Abbiamo generato motoneuroni da cellule iPS-SMA (derivate da fibroblasti del paziente), iPS-TR (iPS SMA trattate con l'oligonucleotide) e iPS-WT (derivate dai fibroblasti del padre portatore sano). Per ottenere il differenziamento in senso motoneuronale abbiamo utilizzato un protocollo già descritto in letteratura per le cellule embrionali staminali umane [187], rappresentato schematicamente nella Figura 9.

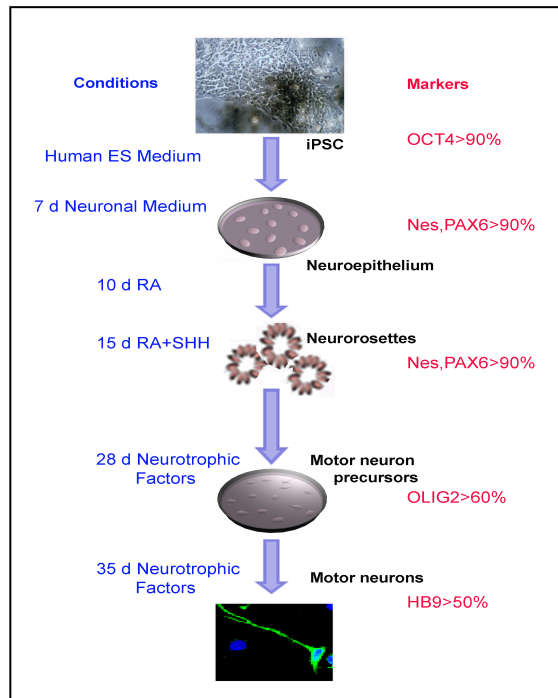


Figura 9. Rappresentazione schematica del differenziamento delle iPS in MN.

---

## RISULTATI

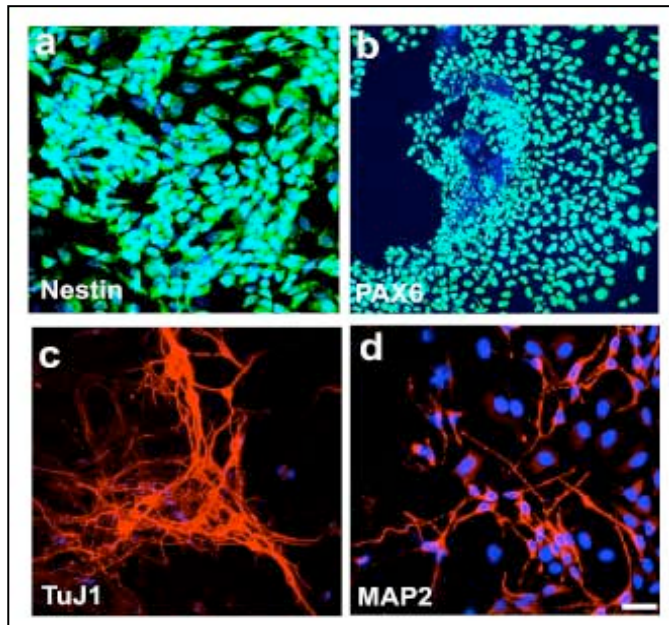
---

*Scheme of differentiation of MNs from iPSCs. The starting iPSCs are positive for OCT4. Le cellule neuroepiteliali (NE) primitive sono positive per PAX6. I progenitori dei MN che esprimono OLIG2 sono presenti alla 4° settimana. I MN ottenuti risultano positive al marcatore HB9*

La prima tappa consisteva nell'indurre il fenotipo neuronale delle cellule iPS coltivandole in terreno neuronale. In questo modo le cellule iPS-SMA, iPS-TR e iPS-WT si sono differenziate in cellule positive per la nestina, esprimendo il fenotipo tipico di cellule staminali neuronali. Dopo qualche giorno si sono formate le rosette neuronali e al 10° giorno abbiamo aggiunto acido retinoico (RA) al terreno di coltura. Oltre alla positività per la nestina, le cellule co-esprimevano PAX6, altro marcatore neuroectodermico specifico (Figura 10).

Dopo 15 giorni le rosette neuronali sono state prelevate e piastrate in terreno contenente due fattori di patterning (RA, fattore di caudalizzazione, e sonic hedgehog (Shh), morfogeno ventralizzante) e neurotrofine. Sono state cresciute in adesione in piastre trattate con laminina dove abbiamo osservato uno sviluppo simil-neuronale.

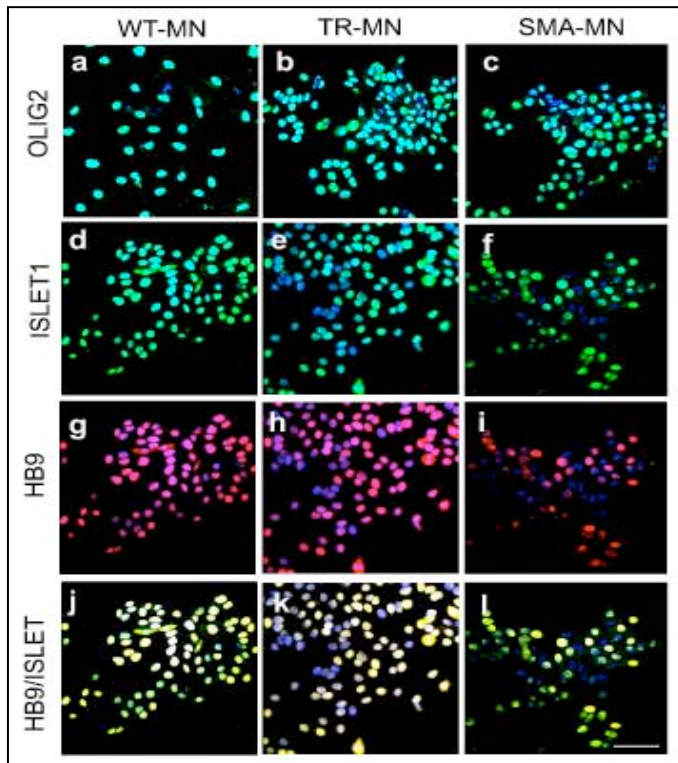
La maggior parte di queste cellule sono risultate positive per la  $\beta$ -Tubulina IIIb (TuJ1), e, dopo un differenziamento ulteriore, anche per MAP2, confermando la loro natura neuronale (Figura 10).



**Figura 10.** Differenziamento delle iPSC in cellule neuronali. Dopo 10 giorni le iPSC differenziano in cellule nestina positive (a). Queste cellule inoltre esprimono PAX6, marcatore specifico del neuroectoderma (b). La generazione di cellule neurali è confermata dall'espressione della  $\beta$ -tubulina IIIb (TuJ1, c) e della proteina associata ai microtubuli 2 (MAP2, d). Scale bar: a, 100  $\mu$ m; b, 75  $\mu$ m; c and d, 100  $\mu$ m

#### 4.3.2 Caratterizzazione dei motoneuroni

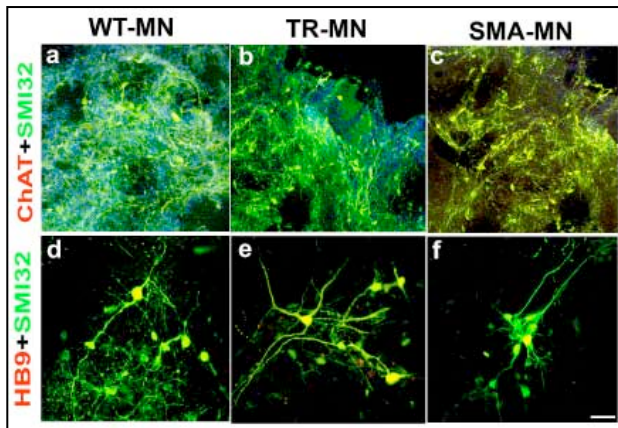
Per promuovere il differenziamento completo in senso motoneuronale abbiamo aggiunto nel terreno di coltura dei fattori neurotrofici, diminuendo l'apporto di RA e Shh. Dopo 4-5 settimane le cellule esprimevano i fattori di trascrizione neuronale HB9, ISLET1 e OLIG2 (marcatori di cellule progenitrici del midollo spinale) (Figura 11).



**Figura 11.** Espressione di fattori motoneuronali specifici. Dopo 4-5 settimane di differenziamento le cellule neuronali ottenute esprimono fattori di trascrizione motoneuronali specifici come OLIG2 (a-c), ISLET1 (d-f) e HB9 (g-i). j-l: merge HB9-ISLET. I nuclei sono stati marcati con DAPI. Scale bar: 75  $\mu$ m



Inoltre queste cellule co-esprimevano proteine neuronali quali TuJ1, NF e MAP2. Dopo 30 giorni abbiamo notato l'aumento di motoneuroni esprimenti HB9, mentre diminuivano i progenitori esprimenti OLIG2. Quasi tutte le cellule positive per HB9 erano anche positive per ISLET1 e sono state considerate motoneuroni. La maggior parte delle cellule HB9/ISLET1 positive esprimeva anche la colina acetiltransferasi (ChAT), enzima chiave per la sintesi di acetilcolina, ed erano positive anche per il marcatore motoneuronale SMI-32, mostrando così un fenotipo di motoneuroni maturi dopo 5 settimane di differenziamento (Figura 12).



**Figura 12.** Differenziamento in motoneuroni. La maggior parte delle iPSC differenziate in neuroni sono positive al marker motoneuronale SMI32 (a-f) e esprimono l'acetilcolintransferasi (ChAT) (a-c), enzima utile per la sintesi di acetilcolina e il fattore di trascrizione motoneuronale HB9 (d-f). I nuclei sono stati marcati con DAPI (blue, a-c). Scale bar: a–c, 150  $\mu$ m; d–f, 100  $\mu$ m

All'esame microscopico queste cellule presentavano la morfologia tipica dei motoneuroni: erano grandi cellule, multipolari, presentavano processi dendritici e lunghi assoni. La quantificazione delle cellule ha rilevato che il numero di neuroni ChAT/SMI32 positivi era del  $57.7 \pm 4.7\%$  nei motoneuroni wild type,  $53.6 \pm 5.1\%$  nelle cellule SMA e  $56.6 \pm 4.8\%$  nelle cellule trattate (n=15 esperimenti indipendenti dopo 5 settimane).

#### 4.3.3 Purificazione dei motoneuroni

Sebbene il protocollo di differenziamento in vitro generi un'alta percentuale di motoneuroni, quello che si ottiene è una popolazione cellulare mista con la presenza di cellule anche non motoneuronali.

Data la bassa disponibilità di marcatori di superficie per isolare i motoneuroni, per purificarli ulteriormente abbiamo utilizzato una tecnica basata sul gradiente di centrifugazione, già descritta per la selezione di motoneuroni primari e per i

motoneuroni derivati da cellule staminali embrionali [193]. Le cellule sono state messe in gradienti di densità discontinui dopo 5 settimane di differenziamento. Dopo la centrifugazione, le cellule all'interfaccia tra i diversi gradienti sono state raccolte, risospese nel medium e successivamente ripiastrate. L'analisi immunochimica ha dimostrato che le cellule ChAT/SMI32/HB9 positive erano il  $78.4 \pm 6.7\%$  nelle cellule WT, il  $74.9 \pm 7.1\%$  nelle cellule trattate, e il  $77.3 \pm 6.6\%$  nelle cellule SMA (Figura 13). Questi dati suggeriscono che i motoneuroni possono essere arricchiti tramite il gradiente di centrifugazione senza il bisogno di un marcatore di superficie o di un reporter transgenico.

#### **4.4 Differenze specifiche tra motoneuroni SMA, motoneuroni wild type e motoneuroni trattati con ODN**

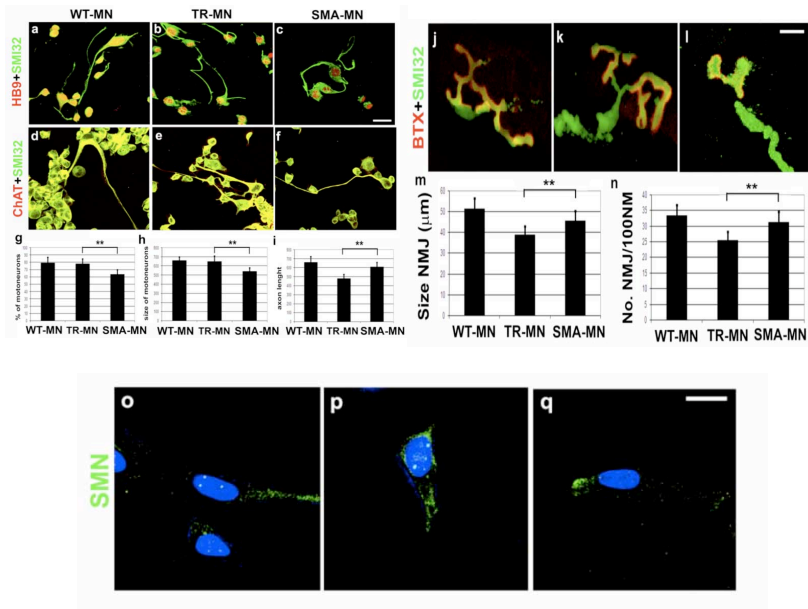
Per verificare le variazioni fenotipiche indotte dalla correzione genetica nelle iPSC-SMA ci siamo inizialmente concentrati sulle loro caratteristiche macroscopiche. Le prime differenze sono state evidenti dopo 7-8 settimane di coltura.

Dopo 8 settimane il numero di motoneuroni nelle colture di iPSC-SMA ( $63.3 \pm 6.4\%$ ) era ridotto rispetto a quello osservato nelle colture di iPSC-WT ( $79.5 \pm 7.2\%$ ). Inoltre i MN del paziente presentavano dimensioni ridotte ( $540.13 \mu\text{m}^2 \pm 38.6$ ) rispetto a quelli WT ( $658.7 \mu\text{m}^2 \pm 40.7$ ) (Figura 13), anche se dopo 5 settimane di coltura le dimensioni dei motoneuroni erano simili tra due gruppi ( $652.8 \mu\text{m}^2 \pm 64.4$  e  $672.6 \mu\text{m}^2 \pm 54.2$  rispettivamente).

Abbiamo successivamente analizzato i motoneuroni prodotti dalle cellule iPSC trattate con l'ODN. Dopo 8 settimane di coltura il loro numero e la loro dimensione erano superiori rispetto ai MN ottenuti dalle cellule non trattate (MN trattati:  $77.9 \pm 6.8\%$ ;  $P < 0.00001$ ; dimensioni:  $648.3 \mu\text{m}^2 \pm 59.8$ ) (Figura 13). La quantificazione dei gems nucleari ha dimostrato che nelle cellule trattate era presente un aumentato numero di gems rispetto a quelli presenti nei MN non trattati.

Abbiamo successivamente osservato gli altri elementi caratteristici dei MN considerati critici per la patogenesi della SMA: la crescita assonale e la formazione delle placche neuromuscolari (NMJ). A 8 settimane la lunghezza assonale media era significativamente inferiore (27%) nei MN-SMA rispetto ai MN-WT ( $480.6 \pm 43.2 \mu\text{m}$  vs  $660.7 \pm 69.5 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.00001$ ), mentre gli assoni dei MN corretti con l'ODN erano significativamente più lunghi di quelli dei MN non trattati ( $608.6 \pm 51.1 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.00001$ ) (Figura 13).

Infine abbiamo analizzato l'abilità dei MN derivati dalle iPSC di formare NMJ in una co-coltura con miotubi, valutando due parametri: il numero e la dimensione delle NMJ formate. I miotubi sono stati marcati con  $\alpha$ -bungarotossina per identificare i recettori dell'acetilcolina. Abbiamo dimostrato che i MN-SMA generavano meno giunzioni e con dimensioni minori rispetto a MN-WT, mentre la larghezza media delle giunzioni era maggiore nelle cellule trattate rispetto a quelle non trattate ( $P < 0.00001$ ). Abbiamo quindi dimostrato che i motoneuroni possono essere ottenuti dalle cellule iPSC-SMA con metodi non virali e che il danno cellulare dovuto all'alterazione del gene SMN può essere recuperato con la correzione genica.



**Figura 13.** Differenziamento di iPSC-WT, -SMA e -TR in motoneuroni. Le iPSC-WT, -SMA e -TR possono differenziare in motoneuroni (a-f). Dopo 5 settimane di differenziamento i MN sono positivi per SMI32 (verde), HB9 (rosso) (a-c) e ChAT (rosso) (d-f). I nuclei sono marcati con DAPI (blue). Analisi morfometriche dei MN a 8 settimane (g-i): conta motoneuronale espressa in % di MN rispetto alle cellule totali (g); dimensione dei MN (h); lunghezza assonale, \*\*  $P < 0.00001$  (i). Sono state ottenute giunzioni neuromuscolari (NMJ) coltivando i MN (j: MN-WT; k: MN-TR; l: MN-SMA) in co-cultura con i miotubi (j-l). Il recettore dell'acetilcolina è stato marcato con  $\alpha$ -bungarotoxin (rossa); gli assoni terminali con SMI32 (verde). Sono stati valutati due parametri, la dimensione (m) e il numero (n) delle giunzioni neuromuscolari ottenute. E' stata inoltre analizzata la presenza di gems nucleari nei MN, la loro presenza è stata dimostrata nei MN-WT (o) e nei MN-TR (p), mentre i gems sono assenti nei MN-SMA (q). Scale bar: a-f, 75  $\mu$ m; j-l, 20  $\mu$ m; o-q, 50  $\mu$ m

#### 4.5 Trapianto di motoneuroni derivati dalle iPSC in un modello murino di SMA

Il nostro obiettivo successivo è stato quello di determinare se i motoneuroni derivati dalle cellule iPS fossero in grado di integrarsi e sopravvivere una volta trapiantati nel midollo spinale di un topo SMA, l'effetto dell'ambiente malato sulle cellule trapiantate e vice-versa e se il trapianto migliorasse il fenotipo dei topi SMA.

I MN purificati sono stati utilizzati per il trapianto nel midollo spinale di topi SMA di un giorno di vita, abbiamo confrontato l'efficacia terapeutica di MN-WT, MN-SMA e MN-TR. Dopo il trapianto tutti i gruppi di topi sono stati monitorati giornalmente (analisi della funzione neuromuscolare e sopravvivenza) e inoltre sono stati analizzati il midollo spinale e le giunzioni neuromuscolari. Non ci sono stati effetti collaterali nei topi trattati e nessun episodio di crescita cellulare eccessiva, escludendo l'eventuale formazione di tumori.

Dopo il trattamento abbiamo rilevato un miglioramento sia nel fenotipo sia nella sopravvivenza dei topi SMA trattati rispetto ai topi non trattati della stessa età (Figura 14 a,b). La sopravvivenza registrata nei topi SMA non trattati era di  $13.33 \pm 1.61$  giorni, mentre nei topi trattati è risultata di  $21.25 \pm 2$  giorni, è quindi aumentata di 7.92 giorni rappresentando un guadagno del 59.41%. I topi trattati con i MN-SMA hanno avuto un miglioramento lievemente inferiore nella sopravvivenza se confrontati con quelli trapiantati con MN-WT (log-rank test; gruppo MN-WT vs. MN-SMA,  $\chi^2=13.26$ ,  $P=0.00027$ ), mentre i MN-TR hanno avuto una maggiore efficacia terapeutica se paragonati con i MN-SMA (log-rank test; gruppo MN-TR vs. MN-SMA,  $\chi^2=9.71$ ,  $P=0.0018$ ). La sopravvivenza registrata nel gruppo di topi trattati con i MN-SMA era di  $19.04 \pm 1.88$  giorni mentre nel gruppo ricevente i MN-TR era di  $20.83 \pm 2.28$  giorni, quindi abbiamo rilevato un aumento di 5.84 giorni nel gruppo MN-SMA e di 7.5 giorni nel gruppo MN-TR, rispettivamente un aumento del 43.8% e del 56.3% (Figura 14 b). Come ulteriore controllo abbiamo trattato un gruppo di topi con fibroblasti umani primari (Figura 14 b), osservando un trend simile a quello dei topi malati non trattati (fibroblasti:  $13.42 \pm 1.69$  giorni; MN-WT vs. fibroblasti,  $\chi^2=49.9$ ,  $P<0.00001$ ).

Uno dei primi sintomi della patologia nei topi SMA è la perdita di peso, infatti, al 5° giorno di vita i topi SMA presentano una perdita di peso significativa rispetto ai topi WT, differenza che persiste durante tutta la durata della vita (ANOVA/Tukey; SMA non trattati vs topi WT  $P<0.00001$ ; Figura 14 c). Dopo il trattamento tutti i topi hanno avuto un aumento di peso che è risultato statisticamente significativo al 13° giorno di età (ANOVA/Tukey; MN-WT vs non trattati,  $P<0.00001$ ; MN-SMA vs non trattati,  $P<0.00001$ ; MN-TR vs non trattati,  $P<0.00001$ ).

Per determinare eventuali miglioramenti nella funzione neuromuscolare abbiamo esaminato i topi trattati e WT tramite grip e open-field test, già precedentemente utilizzati per la valutazione neuromuscolare nei topi SMA [106,108]. Al 13° giorno di età tutti i tre gruppi di topi trattati erano in grado di svolgere il grip test per pochi secondi, mentre quelli non trattati non erano in grado di svolgere il test (ANOVA e Tukey, MN-WT vs non trattati,  $P<0.00001$ ; MN-SMA vs non trattati,  $P<0.00001$ ; MN-TR vs non trattati,  $P<0.00001$ ) (Figura 14 d). Tutti i topi trattati hanno dimostrato il mantenimento dell'attività locomotoria e del comportamento esplorativo (13 giorni, ANOVA e Tukey, MN-WT vs non trattati,  $P<0.00001$ ; MN-SMA vs non trattati,  $P<0.00001$ ; MN-TR vs non trattati,  $P<0.00001$ ).

#### 4.5.1 I motoneuroni trapiantati si integrano nel midollo spinale dei topi SMA

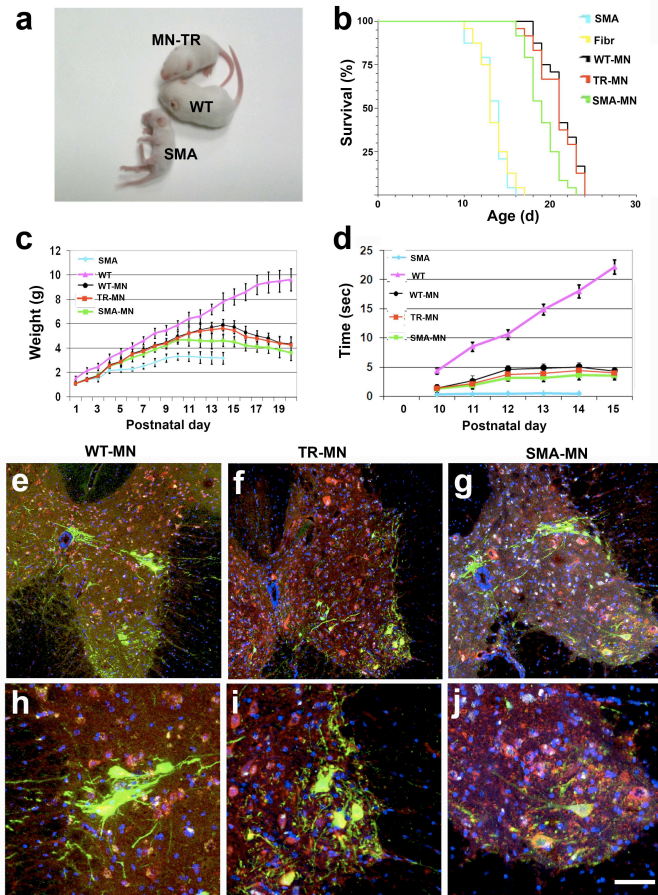
Abbiamo valutato se, dopo il trapianto, i MN sopravvivevano e mantenevano un fenotipo appropriato nel midollo spinale dei topi SMA. In tutti i topi trattati abbiamo identificato i MN-GFP umani all'interno del midollo spinale, in particolare nella materia grigia delle corna ventrali (Figura 14 e-j).

Le analisi quantitative hanno dimostrato che le cellule GFP+ erano circa il 9.9% nel gruppo 1 (MN-WT), per definire il fenotipo di queste cellule GFP+ abbiamo analizzato sezioni di midollo spinale tramite immunistochemical e microscopia confocale utilizzando marker neuronali. I MN-GFP co-esprimevano antigeni specifici neuronali come NF, MAP2, e NeuN (Figura 14 e-j). Inoltre queste cellule mostravano un fenotipo motoneuronale (SMI-32) e co-esprimevano HB9 e ChAT, indicando un'identità colinergica. La doppia positività per HB9 e GFP ha dimostrato che il  $77.5 \pm 5.1\%$  delle cellule attecchite erano motoneuroni.

L'analisi quantitativa del gruppo trattato con i MN-SMA ha dimostrato che le cellule trapiantate erano il 6.9% rispetto al 9.1% del gruppo tre (MN-TR). La doppia positività per HB9 e GFP ha rivelato che nel gruppo MN-SMA le cellule attecchite erano il  $71.2 \pm 4.3\%$ , invece nel gruppo MN-TR erano il  $74.3 \pm 4.5\%$ . Questi dati hanno dimostrato che il gruppo trattato con i MN-SMA presentava un numero ridotto di cellule in confronto ai gruppi trattati con MN-WT e MN-TR ( $P < 0.00001$ ).

Per valutare se i MN trapiantati potessero estendere i loro assoni fuori dal midollo spinale dei topi SMA, abbiamo analizzato le radici ventrali situate all'interno dei due siti di iniezione tramite immunistochemical, contando il numero degli assoni GFP+ che co-localizzavano con il marker NF.

Abbiamo individuato assoni GFP+ nelle radici anteriori dei topi trattati (MN-WT:  $39 \pm 5$ ; 1.3% di MN,  $n = 3,036$ ; MN-SMA:  $19 \pm 3$ ; 1.0% di MN,  $n = 1,940$ ; MN-TR:  $35 \pm 4$ ; 1.3% di MN,  $n = 2,720$ ), suggerendo la capacità delle cellule trapiantate di estendere gli assoni verso la periferia.



**Figura 14.** I MN trapiantati si integrano nel midollo spinale dei topi SMA trattati e migliorano la sopravvivenza, il fenotipo e le funzioni neuromuscolari. Topo SMA trattato con MN-TR (MN-TR), topo SMA non trattato (SMA) e topo WT (WT) (a). Il topo SMA trattato è più grande rispetto a quello non trattato, tutti i topi sono stati fotografati a P13. Curva di sopravvivenza Kaplan-Meier dei topi SMA trattati con MN-WT, MN-SMA, MN-TR, fibroblasti umani primari e solo veicolo (b). La sopravvivenza dei topi trattati con i MN è significativamente migliorata rispetto alla sopravvivenza dei topi non trattati o trattati con i fibroblasti mice ( $P < 0.00001$ , respectively, log-rank test). Curva di crescita dei topi trattati con i MN, non trattati e dei topi WT (c). Ogni punto mostra il peso giornaliero e la barra di errore rappresenta la deviazione standard. I topi SMA trattati presentano un aumento di peso rispetto ai topi SMA non trattati (13 giorni,  $P < 0.00001$ ). Tempo del grip test

*dei topi SMA trattati, non trattati e WT (d). Il tempo di grip è statisticamente diverso tra i topi trattati e non ( $P < 0.00001$ ) a 13 giorni di età. La barra di errore rappresenta la deviazione standard. I MN trapiantati nei topi SMA si integrano nelle corna anteriori del midollo spinale (e-j); immagine merge del segnale rosso di NeuN e MAP2 (f,g,i,j) e il segnale verde della GFP. Scale bar: e-g, 250  $\mu\text{m}$ ; h-j, 100  $\mu\text{m}$*

#### **4.5.2 I motoneuroni trapiantati hanno un effetto positivo sui motoneuroni SMA e sulle loro connessioni con i muscoli**

Per analizzare la correlazione tra il miglioramento neuromuscolare, l'aumento di sopravvivenza dei topi SMA trattati e gli aspetti neuropatologici abbiamo eseguito analisi istologiche dei muscoli e del midollo spinale di un gruppo di topi all'età di 13 giorni e abbiamo determinato il numero e la dimensione dei MN situati all'interno delle corna ventrali e del tratto lombare (topi trattati con MN-WT n=6; topi trattati con MN-SMA n=6; topi trattati con MN-TR n=6; topi SMA non trattati n=6; e topi WT n=6).

A P13 i topi SMA non trattati presentavano una riduzione significativa nel numero e nella dimensione dei MN in confronto ai topi WT ( $P < 0.00001$ ). Il trapianto di MN ha indotto un aumento di  $8.91 \pm 1.39$  neuroni per corno ventrale nei topi SMA trattati con MN-WT, di  $7.78 \pm 1.31$  nei topi trattati con MN-SMA e di  $7.36 \pm 1.3$  nel gruppo trattato con MN-TR. Il numero di MN nei topi WT non trattati era di  $9.55 \pm 1.37$  e di  $5.82 \pm 1.35$  nei topi SMA, dimostrando che il numero di MN era significativamente aumentato nei topi trattati in confronto a quelli non trattati ( $P < 0.00001$ ).

Nel gruppo MN-WT le cellule trapiantate rappresentavano il 27.5% dei MN totali e i MN endogeni sono aumentati del 6.8% in confronto ai topi SMA non trattati, inoltre i MN endogeni dei topi trattati presentavano una dimensione maggiore, si deduce quindi che il trapianto di MN umani (hMN) esercita un effetto neuroprotettivo.

Una caratteristica dei topi SMA è l'atrofia muscolare [106,108]. In confronto ai topi WT l'area, il diametro e il numero delle miofibre del muscolo anteriore tibiale nei topi SMA sono significativamente ridotti; il trapianto di MN ha indotto un aumento dell'area ( $P < 0.00001$ ), del diametro ( $P < 0.00001$ ) e del numero delle miofibre ( $P < 0.00001$ ). I cambiamenti a livello dell'area muscolare sono stati osservati anche nei topi trapiantati con MN-SMA e i MN-TR ( $P < 0.00001$ ).

#### **4.5.3 I motoneuroni umani producono fattori neuroprotettivi che possono contribuire all'effetto positivo associato al loro trapianto**

Per analizzare i meccanismi alla base dei miglioramenti dei topi SMA trattati abbiamo valutato se i hMN producessero fattori neurotrofici con un putativo ruolo neuroprotettivo su altri motoneuroni (Figura 15). Abbiamo eseguito il profilo dei fattori neurotrofici rilasciati dai MN derivati dalle iPSC tramite ELISA (Figura 15 a-d) e abbiamo confrontato i livelli di espressione con quelli dei fibroblasti umani. Da quest'analisi è risultato che i MN-WT, i MN-SMA e i MN-TR esprimevano e rilasciavano una quantità significativa di neurotrofine e fattori di crescita come, la

neurofina 3 (NT-3) ( $233.35 \pm 23.79$  pg/ml, MN-WT 9 volte di più dei fibroblasti,  $P < 0.00001$ ), la neurofina 4 (NT-4) ( $254.69 \pm 26.12$  pg/ml, MN-WT 15 volte di più dei fibroblasti,  $P < 0.00001$ ), il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) ( $347.35 \pm 36.8$  pg/ml, MN-WT 18 volte di più dei fibroblasti,  $P < 0.00001$ ), e il fattore di crescita dei nervi (NGF) ( $123.25 \pm 18.4$  pg/ml, MN-WT 4 volte di più dei fibroblasti,  $P < 0.00001$ ). Esprimevano inoltre moderati livelli di CTNF (3 volte di più,  $P < 0.00001$ ), bassi livelli di BDNF (1.4 volte di più), GDNF (1.2 volte di più rispetto ai fibroblasti) e non esprimevano TGF-  $\alpha$ .

Per determinare gli effetti dei hMN sugli eventi patogenetici della SMA abbiamo usato un sistema di co-cultura con uno strato sottostante di MN primari derivati da topi SMA (mMN) e uno strato superiore di hMN separati da una membrana porosa che permette il passaggio di sostanze tra i due compartimenti. Come già dimostrato, i MN-SMA primari presentavano una significativa riduzione della lunghezza assonale se confrontati con i MN-WT primari ( $203.5 \pm 20.6$   $\mu$ m vs  $319.8 \pm 31.4$   $\mu$ m,  $P < 0.00001$ ). Quando i MN-SMA primari sono stati messi in co-cultura con hMN questi valori sono migliorati (Figura 15).

Infine abbiamo misurato la dimensione dei coni di crescita assonale usando la marcatura con phospho-tau, i coni di crescita dei MN mancanti di SMN erano significativamente più piccoli rispetto ai MN-WT (SMA:  $15.2 \pm 2.2$   $\mu$ m vs  $41.4 \pm 4.5$   $\mu$ m,  $P < 0.00001$ ); successivamente abbiamo osservato un aumento della dimensione dei coni di crescita dopo la co-cultura tra mMN e cellule staminali neuronali (MN-WT:  $32.4 \pm 2.7$ ; topi SMA trattati vs non trattati,  $P < 0.00001$ ) (Figura 15).

Abbiamo ipotizzato che l'up-regolazione dell'espressione delle neurotrofine possa contribuire all'allungamento assonale, per testare questa ipotesi abbiamo neutralizzato le citochine rilevanti (NT3, NT4, NGF, VEGF) sia individualmente sia in combinazione aggiungendo anticorpi neutralizzanti nel terreno utilizzato per le co-culture. Gli anticorpi neutralizzanti hanno ridotto significativamente la lunghezza assonale dei MN-SMA ( $P < 0.05$ ) (Figura 15).

Per studiare gli effetti dei motoneuroni umani sulla sopravvivenza neuronale in un ambiente neurotossico, i mMN-SMA primari sono stati esposti ad un terreno condizionato dalla microglia o contenente lipopolisaccaridi (LPS) in presenza di hMN. I risultati ottenuti (Figura 15) hanno dimostrato che i motoneuroni umani secernono fattori neuroprotettivi che promuovono la sopravvivenza e l'allungamento assonale dei motoneuroni SMA in un ambiente infiammatorio o tossico *in vitro*.

Basandoci su questi risultati abbiamo analizzato tramite ELISA l'espressione delle neurotrofine nel midollo spinale dei topi SMA trapiantati paragonandola con l'espressione rilevata nel midollo spinale dei topi non trattati e con quella dei topi trattati con fibroblasti. L'analisi del midollo spinale a P13 ha indicato che il trapianto aumentava in modo significativo i livelli di VEGF, NGF, NT4 e NT3 se paragonati con i livelli ottenuti nei topi SMA trattati solo con il veicolo o con i fibroblasti ( $P < 0.00001$ ).

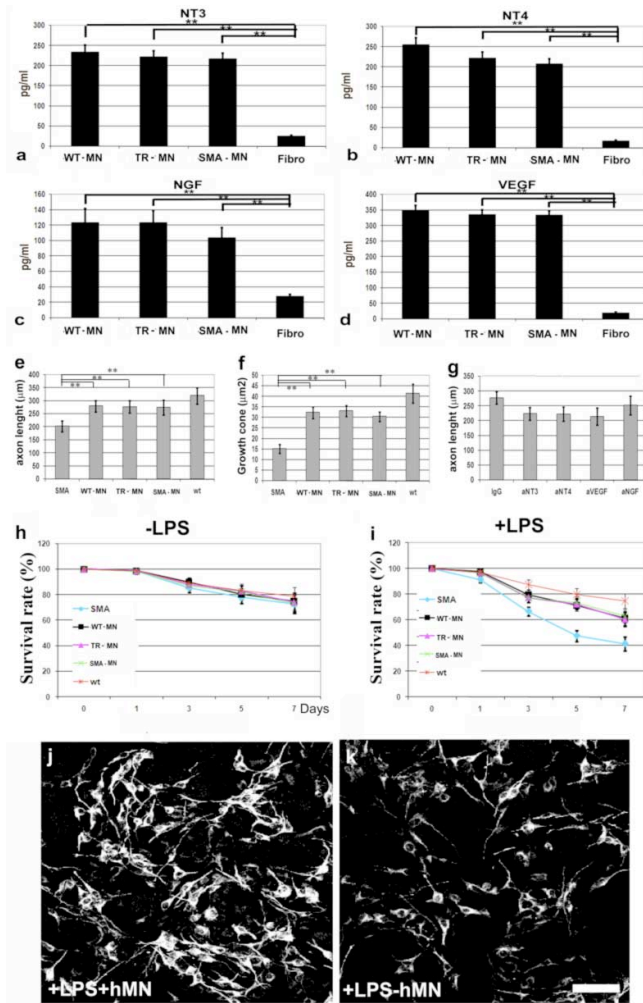


---

## RISULTATI

---

Questi dati suggeriscono che il trapianto di MN può esercitare un effetto neuroprotettivo e terapeutico tramite la produzione di neurotrofine e fattori di crescita.



**Figura 15.** I MN producono fattori neuroprotettivi. Abbiamo analizzato la quantità di neurotrofine prodotte dai MN (a-d). La figura mostra la quantità di NT3 (a), NT4 (b), NGF (c) e VEGF (d) prodotta dai MN, l'analisi è stata fatta tramite ELISA . \*\*  $P < 0.00001$ . Media della lunghezza assonale (e) e dell'area dei coni di crescita (f) dei MN derivati dai topi SMA in co-cultura con MN umani. I MN dei topi SMA in co-cultura con i MN umani esibiscono un aumento significativo della lunghezza assonale e dell'area dei coni di crescita rispetto ai MN non trattati (\*\*  $P < 0.00001$ ). La lunghezza assonale dei MN è ridotta dopo la neutralizzazione delle citochine nella co-cultura con i MN umani ( $P < 0.05$ ) (g). Quantificazione del numero di MN murini SMA SMI32 positivi in presenza di MN umani e terreno condizionato con

---

## RISULTATI

---

*microglia con (i) e senza (h) esposizione a LPS. Il numero di MN in coltura senza LPS non è significativamente differente ( $P < 0.05$ ) tra le colture esposte al terreno di controllo o in co-coltura con MN umani, comunque il numero dei MN nelle colture contenenti LPS è ridotto, mentre nelle co-culture è significativamente aumentato. Immunofluorescenza per SMI32 nelle colture esposte a terreno condizionato con microglia in presenza di LPS con (j) o senza (k) co-coltura con MN umani. Scale bar = 50  $\mu\text{m}$*

## 5. DISCUSSIONE

L'atrofia muscolare spinale è una grave malattia neuromuscolare per cui al momento non è disponibile una cura efficace. Le cellule staminali, e le cellule iPS in particolare, rappresentano uno strumento promettente sia come modello *in vitro* della malattia, utile per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche e molecolari, sia come sorgente per un eventuale trapianto cellulare. Per portare la tecnologia della riprogrammazione dalla ricerca di base all'applicazione clinica, lo sviluppo di una strategia efficace che permetta la generazione di cellule iPS libere da elementi esogeni è un elemento cruciale. Esistono diversi approcci che potrebbero permettere il raggiungimento di questo obiettivo: (1) l'utilizzo di vettori che non si integrano nel genoma; (2) l'utilizzo di vettori integranti che possono successivamente essere rimossi dal genoma; (3) l'utilizzo di tecniche che non usano vettori costituiti da acidi nucleici, come ad esempio l'utilizzo di proteine riprogrammanti o di mRNA [194].

L'ultimo approccio non è abbastanza efficiente e richiede una tecnologia chimica complessa, mentre il secondo si basa su manipolazioni genomiche relativamente estese. Per questo lavoro abbiamo quindi, deciso di utilizzare il primo metodo usando un sistema basato sull'over-espressione simultanea di fattori di riprogrammazione tramite plasmidi non virali. Questo protocollo è stato precedentemente descritto in letteratura applicato ai fibroblasti neonatali [152]. Abbiamo riprodotto il metodo dimostrando la riprogrammazione di cellule adulte, estendendo la sua applicazione ad un target di popolazione più ampio. Anche se l'efficienza di riprogrammazione è più bassa rispetto alle strategie basate su vettori integranti, va considerato che questo metodo, con i suoi principi molecolari e il protocollo lineare, è un'opzione promettente per la generazione di cellule iPS.

L'utilizzo di vettori oriP/EBNA1 ci ha permesso di ottenere cellule iPS-SMA umane libere da vettori e sequenze transgeniche. Il gruppo di Ebert (2009) ha precedentemente descritto la produzione di cellule iPS-SMA e MN-SMA con metodi virali. Il nostro lavoro rappresenta un passo successivo, perché abbiamo ottenuto e caratterizzato motoneuroni paziente-specifici senza indurre modificazioni genetiche, aumentando così l'applicabilità delle cellule nella ricerca di base e nello sviluppo di strategie di trapianto. Abbiamo allevato le cellule iPS senza utilizzare il siero e il feeder durante il periodo di coltura, avvicinandoci così a metodi di coltura applicabili nella pratica clinica.

Per riuscire a utilizzare al massimo il potenziale terapeutico delle cellule iPS sono necessari studi volti a correggerne il genotipo, recuperando il livello necessario di espressione della proteina SMN, in modo da poter utilizzare le cellule autologhe del paziente per eventuali strategie terapeutiche. Attualmente, la terapia genica è la strategia terapeutica più attraente per la SMA. Infatti, nel 2010 quattro gruppi hanno descritto il completo recupero dei topi SMA dopo un'iniezione intravenosa di AAV codificante per l'SMN [155,189,191,195].

La terapia genica e cellulare possono essere strategie terapeutiche complementari, tuttavia la terapia genica basata sull'utilizzo di vettori virali

presenta problemi di sicurezza ed è limitata a causa di possibili reazioni immunologiche e dell'espressione transiente di costrutti.

Nella patogenesi della SMA la diminuzione di SMN è causata dalla perdita del gene SMN1. Anche se il gene SMN2, occasionalmente presente in copie multiple, può parzialmente migliorare il fenotipo della malattia, il livello di espressione di questo gene è spesso insufficiente per il recupero totale. A livello genico SMN2 si differenzia da SMN1 nella posizione +6 dell'esone 7, dove una T va a sostituire una C. Questo cambiamento altera il pattern di splicing e la proteina risultante manca dell'informazione contenuta nell'esone 7 [15]. Una delle strategie per correggere il genoma e aumentare i livelli della proteina SMN potrebbe essere quello di convertire il gene SMN2 nel gene SMN1. In letteratura è stato descritto a tale scopo l'approccio con un oligonucleotide a singolo filamento (ODN), che promuove lo scambio nucleotidico da T a C nel locus del gene SMN2 aumentando i livelli di proteina SMN funzionante [158]. Questa strategia terapeutica è specifica e non necessita somministrazioni ripetute (il cambio della base nucleotidica è permanente ed ereditabile), non introduce geni esogeni e il rischio di mutazioni inserzionali è ridotto. Inoltre presenta vantaggi in termini di sicurezza e di riduzione della potenziale reazione immunologica.

Il limite maggiore di questo metodo è la bassa efficienza della conversione genica, ostacolo che si sta riducendo grazie ai recenti sviluppi nel campo della tecnologia basata sugli ODN e grazie alle nuove strategie applicabili *ex vivo* (le iPSC) [196].

Nel nostro lavoro abbiamo indotto una correzione genica non-virale permanente delle cellule iPS-SMA, utilizzando un ODN specifico che permette la conversione del gene SMN2 nel gene SMN1, modificando una singola base nell'esone 7. Abbiamo utilizzato un ODN di 75 basi di lunghezza, disegnato per ibridarsi al filamento trascritto del DNA a livello del gene SMN2. L'ibridazione risulta perfetta ad eccezione del singolo mismatch (T/G) nel centro della sequenza di SMN2, che agisce da segnale per la riparazione genica, permettendo lo scambio della T con C. Il secondo evento ripartivo per il mismatch A/C converte A in G, in modo da ottenere il corretto appaiamento C-G nella zona target. I nostri esperimenti rappresentano la prima descrizione di una correzione genica di iPSC umane con questa tecnica e i risultati ottenuti supportano l'ipotesi che le disfunzioni motoneuronali abbiano un ruolo chiave nella patogenesi della SMA [153], inclusa la ridotta crescita assonale e la ridotta formazione delle NMJ.

La correzione genica ottenuta ha migliorato le caratteristiche neuropatologiche della SMA nei motoneuroni *in vitro*, infatti, abbiamo osservato un aumento di espressione di SMN e la presenza della proteina SMN all'interno dei "gems", il cui numero è correlato inversamente con la severità della malattia [17]. I risultati del nostro lavoro evidenziano che le cellule corrette *ex vivo* migliorano il loro fenotipo e possono essere usate per la ricerca di base *in vitro* e anche come potenziale sorgente per la terapia cellulo-mediata nella SMA.

Dopo aver differenziato le iPSC ottenute in motoneuroni le abbiamo trapiantate in un modello murino di SMA e abbiamo osservato che i MN si integrano nel midollo spinale e mantengono lo specifico fenotipo motoneuronale. Per quanto riguarda i

MN-SMA abbiamo osservato che presentano una ridotta sopravvivenza, una ridotta dimensione e una bassa propensione all'allungamento assonale. Questo suggerisce che il trapianto di MN-SMA può produrre un modello *in vivo* complementare al modello *in vitro*, utilizzato per lo screening di molecole farmacologiche.

Grazie alla terapia genica tramite ODN si possono correggere le caratteristiche patologiche dei MN-SMA aprendo la strada alla possibilità di una terapia cellulare autologa.

I topi SMA trapiantati presentavano un significativo aumento della sopravvivenza (circa <50%) se comparati con i topi trattati con il solo veicolo, questo effetto è più evidente se vengono trapiantati con i MN-WT e i MN-TR rispetto ai MN-SMA, confermando le caratteristiche patologiche di quest'ultimi. Questi effetti positivi sono specifici del trapianto di MN, infatti non si osservano dopo il trapianto di fibroblasti.

L'aumento di sopravvivenza osservata dopo il trapianto di MN sembra essere limitato rispetto ad altri risultati, come ad esempio quelli ottenuti con la terapia genica, ma è importante considerare due aspetti: (1) Il potenziale del trapianto motoneuronale non è totalmente apprezzabile se si considera che questo modello animale permette la formazione di nuove NJM per un periodo limitato di tempo; e (2) la terapia genica, basandosi sui dati ottenuti fino ad oggi, sembra essere applicabile solo nel primo stadio della SMA.

Per determinare se l'età del trattamento influenzasse il risultato della terapia genica, è stato condotto uno studio in cui sono stati trattati topi SMA di diverse età (2, 5, 10 giorni) e sono stati valutati gli effetti del trattamento sulla sopravvivenza. I topi trattati a 2 giorni di età hanno dimostrato il recupero della funzione neuromuscolare e un aumento di sopravvivenza, mentre quelli trattati a 5 giorni hanno dimostrato un recupero meno significativo e quelli trattati a 10 giorni non hanno avuto alcun beneficio [195].

Questi risultati suggeriscono che si ottiene un beneficio solo nel primo stadio della SMA, la possibilità di rimpiazzare i MN endogeni perduti è invece l'obiettivo primario poiché premetterebbe il trattamento di pazienti SMA già sintomatici. Tuttavia il raggiungimento di questo traguardo è ancora lontano e richiede molti altri studi e sperimentazioni.

Il trapianto di MN migliora in modo significativo anche la funzione neuromuscolare, effetto che correla con il numero di MN trapiantati e con l'aumento di dimensione e di numero dei MN endogeni, suggerendo un effetto neuroprotettivo dato dal trapianto. Abbiamo già dimostrato in precedenza che il trapianto di NSC murine, una popolazione non differenziata rispetto ai MN post-mitotici utilizzati in questo lavoro, ha effetti positivi sul fenotipo dei MN malati nei topi SMA [106,108].

Nel presente studio oltre alla formazione di poche NJM, che contribuiscono in parte al miglioramento fenotipico, abbiamo indagato il potenziale meccanismo che sta alla base del miglioramento del fenotipo nei topi SMA.

Abbiamo dimostrato che i hMN possono produrre molti fattori neurotrofici con un ruolo putativo ad azione paracrina su altri MN, come mostrato dagli esperimenti di

co-coltura. Inoltre, abbiamo analizzato le neurotrofine espresse nel midollo spinale dei topi trattati e dei topi WT. Tutti i topi trattati presentavano aumentati livelli di VEGF, NGF, NT3, e NT4.

Questi dati suggeriscono che il trapianto di MN ha un effetto neuroprotettivo grazie alla produzione di fattori di crescita che esercitano un effetto terapeutico oltre alla sostituzione cellulare. Il nostro è il primo studio che dimostra il trapianto di MN maturi ottenuti da cellule iPSC e i suoi effetti terapeutici sul fenotipo della SMA, questo può essere il primo passo verso lo sviluppo di una terapia efficace per la SMA e altre malattie motoneuronali.

Una nuova area di ricerca, che è emersa recentemente e che si sta sviluppando parallelamente alle tecnologie riguardanti le cellule staminali e la riprogrammazione delle iPSC, è la riprogrammazione diretta. Questa nuova tecnologia prevede il transdifferenziamento di una cellula adulta in un'altra cellula adulta differente senza passare attraverso uno stadio pluripotente. Nonostante questo campo di ricerca sembri nuovo, la sua origine risale al 1980 quando è stato dimostrato che una cellula adulta può essere convertita in un'altra tramite l'over-espressione di fattori di trascrizione specifici. Il transdifferenziamento potrebbe quindi essere un nuovo utile strumento nel campo della medicina rigenerativa poiché potrebbe essere fonte di cellule utili per la riparazione dei tessuti danneggiati. Inoltre il prodotto finale del transdifferenziamento presenta, oltre al vantaggio di derivare da cellule autologhe, anche il vantaggio di fornire cellule già differenziate, mentre le iPSC e le ESC una volta ottenute devono essere sottoposte a procedure di differenziamento verso il fenotipo d'interesse. Inoltre evitando il passaggio attraverso lo stato pluripotente si evita più facilmente il rischio di tumorigenesi dopo il trapianto, anche se l'assoluta assenza di replicazione cellulare può essere svantaggiosa a causa del numero ridotto di cellule disponibili per il trapianto, aspetto molto importante in vista di un'applicazione clinica.

Recentemente è stata dimostrata la generazione di diversi sottotipi neuronali, tra cui i motoneuroni [197]. Son e colleghi hanno dimostrato che l'espressione forzata di fattori di trascrizione specifici è sufficiente per convertire fibroblasti murini (7 fattori) e umani (8 fattori) in motoneuroni. I motoneuroni ottenuti hanno pathway e caratteristiche fisiologiche dei motoneuroni maturi e inoltre formano sinapsi funzionali con i muscoli [197].

Il transdifferenziamento potrebbe quindi diventare uno strumento importante nel campo della medicina rigenerativa, nonostante siano necessari ulteriori studi riguardanti la sicurezza dei fattori somministrati e lo sviluppo di protocolli nei modelli animali, con lo scopo di migliorare questa tecnologia in vista di una potenziale applicazione in studi pre-clinici e clinici.

## 6. CONCLUSIONI

L'atrofia muscolare spinale rappresenta oggi la causa di morte per malattia genetica più frequente nella popolazione infantile, con una incidenza di 1/6000 nati vivi. Da un punto di vista patogenetico è nota ormai da tempo la mutazione alla base di tale patologia, cioè la mutazione del gene SMN sul cromosoma 5, presente in più del 90% dei pazienti [11]. Non è ancora stato chiarito quali pathway risultino alterati in seguito alla mutazione di tale gene e rimane quindi ancora da comprendere perché la mutazione di SMN, gene espresso ubiquitariamente a livello dell'organismo umano, provochi un danno degenerativo specificamente solo a livello dei secondi motoneuroni. La comprensione di tale problematica risulta essere fondamentale per ampliare la conoscenza di questa malattia e soprattutto per riuscire ad identificare nuovi target terapeutici.

Sebbene i modelli animali siano molto utili per lo studio della patogenesi e per lo screening farmacologico, presentano importanti limitazioni nel ricapitolare la malattia. La recente generazione di cellule iPSC rappresenta uno strumento promettente in quanto permette l'ottenimento di un modello in vitro della malattia, utile per lo sviluppo di nuove terapie farmacologiche e molecolari, inoltre queste cellule possono essere utilizzate come sorgente per terapie cellulo-mediate.

In questo lavoro abbiamo generato cellule iPSC con metodo non virale da un paziente SMA di tipo 1 e dal padre portatore eterozigote e abbiamo dimostrato il loro differenziamento in motoneuroni. L'efficienza di riprogrammazione ottenuta tramite i vettori non virali è molto ridotta rispetto ad altri metodi che prevedono l'integrazione dei vettori nel genoma, nonostante ciò il metodo da noi utilizzato potrebbe essere più utile in vista di un eventuale traslazione clinica. Inoltre abbiamo corretto geneticamente le iPSC utilizzando un oligonucleotide single-strand che si lega in modo specifico alla sequenza target (SMN2) e agisce come stampo per la correzione nucleotidica. Le iPSC sottoposte a questa modificazione genetica risultano corrette, non contengono sequenze esogene e sono indistinguibili dalle iPSC sane. Un altro aspetto molto importante da considerare è che la correzione è permanente e i cambiamenti nella sequenza genomica sono ereditabili.

Dato che le iPSC possono rappresentare anche un'abbondante fonte di cellule utili per lo sviluppo di strategie di trapianto abbiamo generato motoneuroni dalle iPSC-SMA, iPSC-corrette e iPSC-WT. Successivamente li abbiamo trapiantati nel midollo spinale di topi SMA di un giorno di vita, osservando che il trapianto di motoneuroni wild-type e corretti migliora la sopravvivenza e il fenotipo dei topi SMA. Abbiamo inoltre dimostrato la sopravvivenza e il mantenimento di un appropriato fenotipo delle cellule trapiantate.

Per analizzare i meccanismi alla base dei miglioramenti dei topi SMA trattati abbiamo valutato il profilo di produzione di citochine e fattori di crescita rilasciati dai motoneuroni per comprendere più a fondo la genesi degli effetti mediati da tali cellule trapiantate. I motoneuroni producono diverse neurotrofine e fattori di crescita tra cui NT3, NT4, VEGF e NGF, esprimono moderati livelli di CTNF, bassi



livelli di BDNF e GDNF e non esprimono TGF- $\alpha$ . Questi fattori neurotrofici hanno un ruolo neuroprotettivo sui motoneuroni endogeni, infatti svolgono funzioni di supporto, di sviluppo e di trofismo e promuovono un processing efficace stimolando l'estensione assonale in vitro ed in vivo [198].

In conclusione abbiamo dimostrato che il trapianto di motoneuroni derivati dalle iPSC ha effetti positivi sul modello murino SMA. Questi miglioramenti sono mediati sia dalla sostituzione dei motoneuroni degenerati (neurogenesi), sia dall'azione trofica, protettiva e di guida alla crescita assonale (neuroprotezione).

In conclusione tutti questi risultati dimostrano la possibilità di ottenere iPSC paziente specifiche prive di elementi esogeni, la loro correzione e il loro differenziamento in motoneuroni. Inoltre emerge il potenziale utilizzo delle iPSC come terapia cellulo-mediata della SMA e di altre patologie del motoneurone.

Le difficoltà nell'ottenere un aumento ulteriore della sopravvivenza suggeriscono che è fondamentale un'ulteriore comprensione dei meccanismi patogenetici della morte motoneuronale per lo sviluppo di una terapia per la SMA. Inoltre altre indagini sono necessarie per delucidare eventuali altri meccanismi responsabili degli effetti benefici riscontrati. La nostra strategia potrebbe non essere in grado di agire efficacemente negli stadi critici precoci di questo modello di SMA (1-3 giorni di vita) poichè l'attecchimento delle cellule richiede tempo per la migrazione, la maturazione e l'insediamento. Aumentare l'efficienza dell'attecchimento e il differenziamento delle cellule donatrici motoneuronali potrebbe migliorare l'efficienza globale anche negli stadi più precoci.

Una possibile strategia per favorire l'integrazione consiste nell'incrementare i segnali attrattivi verso il midollo spinale ospite. Alcune informazioni potrebbero derivare dall'analisi delle capacità migratorie dei motoneuroni e delle iPSC da cui derivano, individuando molecole di superficie come le integrine o proteine enzimatiche secrete in grado di digerire la matrice e di influenzare la migrazione attraverso le meningi e nel parenchima.

Il differenziamento in motoneuroni rappresenta un altro punto cruciale che, secondo i nostri risultati, dipende dai protocolli di priming e dalle caratteristiche della popolazione di partenza. Il protocollo di priming potrebbe essere migliorato utilizzando gli agonisti del pathway del sonic hedgehog [188]. Il trattamento combinato del trapianto cellulare con farmaci o con terapia genica potrebbe aumentare significativamente l'efficacia terapeutica in previsione di un'applicazione clinica.

Il trapianto di cellule staminali potrà avere in futuro un'utilità terapeutica in associazione con altre strategie molecolari e farmacologiche, ma sarà necessaria un'attenta sperimentazione (in vitro e in vivo) prima di una pianificazione di trial clinici nell'uomo.

**BIBLIOGRAFIA**

1. Pearn J. "Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy", *Journal of Medical Genetics*, Vol. 15, no. 6, 1978, pp. 409-413.
2. Wirth B. "An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA)", *Human Mutation*, Vol. 15, no. 3, 2000, pp. 228-37.
3. Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene", *Cell*, Vol 80, no.1, 1995, pp. 155-65.
4. Zerres K, Davies KE. "59th ENMC International Workshop: Spinal Muscular Atrophies: recent progress and revised diagnostic criteria", *Neuromuscular Disorders*, Vol. 9, no. 4, 1999, pp. 272-278.
5. Munsat TL, Davies KE. "International SMA consortium meeting", *Neuromuscular Disorders*, Vol. 2, no. 5-6, 1992, pp. 423-428.
6. Billard C, Gillet P, Signoret JL, Uicaut E, Bertrand P, Fardeau M, Barthez-Carpentier MA, Santini JJ. "Cognitive functions in Duchenne muscular dystrophy: a reappraisal and comparison with spinal muscular atrophy", *Neuromuscul Disorders*, Vol 2, no. 5-6, 1992, pp. 371-378.
7. Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, et al. "Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3", *Nature*, Vol. 344, 1990, pp. 540-541.
8. Wang CH, Kleyn PW, Vitale E, Ross BM, Lien L, Xu J, Carter TA, Brzustowicz LM, Obici S, Selig S, et al. "Refinement of the spinal muscular atrophy locus by genetic and physical mapping", *Am J Hum Genet.* Vol. 56, no. 1, 1995, pp. 202-209.
9. Clermont O, Burlet P, Burglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J, et al. "Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers", *Am J Hum Genet.* Vol. 54, no. 4, 1994, pp. 687-694.

10. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al. "Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene", *Cell*. Vol. 80, no. 1, 1995, pp. 155-165.
11. Monani UR. "Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron-specific disease", *Neuron*. Vol. 48, no. 6, 2005, pp. 885-896.
12. Wirth B, Brichta L, Hahnen E. "Spinal muscular atrophy: from gene to therapy", *Semin Pediatr Neurol*. Vol. 13, no. 2, 2006, pp. 121-131.
13. Lorson CL, Strasswimmer J, Yao JM, Baleja JD, Hahnen E, Wirth B, Le T, Burghes AH, Androphy EJ. "SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity", *Nat Genet*, Vol. 19, 1998, pp. 63-66.
14. Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacène E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J. "Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy", *J Cell Biol*, Vol. 152, 2001, pp. 1107-1114.
15. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD. "A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2", *Hum Mol Genet*. Vol. 8, no. 7, 1999, pp. 1177-1183.
16. Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. "Structure and organization of the human survival motor neuron (SMN) gene", *Genomics*, Vol. 32, 1996, pp. 479-482.
17. Coovert DD, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH. "The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy", *Hum Mol Genet*, Vol. 6, 1997, 1205-1214.
18. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J. "Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy", *Nat. Genet*. Vol. 16, 1997, 265-269.
19. Rochette CF, Gilbert N, Simard LR. "SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens", *Hum Genet*, Vol. 108, no. 3, 2001, pp. 255-266.

20. Brahe C., Servidei S., Zappata S., Ricci E., Tonali P., Neri G., "Genetic homogeneity between childhood-onset and adult-onset autosomal recessive spinal muscular atrophy", *Lancet*, Vol. 346, no. 8977, 1995, pp. 741-742.
21. Feldkotter M., Schwarzer V., Wirth R., Wienker T.F., Wirth B., "Quantitative analyses of SMN1 and SMN2 based on real-time lightCycler PCR: fast and highly reliable carrier testing and prediction of severity of spinal muscular atrophy", *American Journal of Human Genetics*, Vol. 70, no. 2, 2002, pp. 358–368.
22. Cartegni L & Krainer AR. "Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1", *Nat Genet*, Vol. 30, 2002, pp. 377-384.
23. Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F. "Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts", *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 100, Vol. 7, 2003, pp. 4114-4119.
24. Cartegni L, Hastings ML, Calarco JA, de Stanchina E, Krainer AR. "Determinants of exon 7 splicing in the spinal muscular atrophy genes, SMN1 and SMN2", *Am J Hum Genet*, Vol. 78, 2006, pp. 63–77.
25. Hofmann Y & Wirth B. "hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1", *Hum Mol Genet*, Vol. 11, 2002, pp. 2037-2049.
26. Singh NK, Singh NN, Androphy EJ, Singh RN. "Splicing of a critical exon of human survival motor neuron is regulated by a unique silencer element located in the last intron", *Mol Cell Biol*, Vol. 26, 2006, pp. 1333-1346.
27. Lefebvre S., Bürglen L., Frézal J., Munnich A., Melki J. "The role of the SMN gene in proximal spinal muscular atrophy", *Human Molecular Genetics*, Vol. 7, no. 10, 1998, pp. 1531-1536.
28. Rodrigues N.R., Owen N., Talbot K., Ignatius J., Dubowitz V., Davies K.E., "Deletions in the survival motor neuron gene on 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy", *Human Molecular Genetics*, Vol 4, 1995, pp. 631–634.
29. van der Steege G., Grootsholten P.M., van der Vlies P., Draaijers T.G., Osinga J., Cobben J.M., Scheffer H., Buys C.H.. "PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy", *Lancet*, Vol. 345, no. 8955, 1995, pp. 985–986.

30. Ichikawa S., Wang C.H. , "Differential amplification of the SMN gene copies by allele-specific PCR: a new method for rapid diagnosis of spinal muscular atrophy", *American Journal of Human Genetics*, Vol. 63, no 63, 1998, pp. A232.
31. Simsek M., Al-Bulushi T., Shanmugakonar M., Al-Barwani H.S., Bayoumi R., "Allele-specific amplification of exon 7 in the survival motor neuron (SMN) genes for molecular diagnosis of spinal muscular atrophy", *Genetic Testing*, Vol. 7, no. 4, 2003, pp. 325–327.
32. Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lizier C, Zeviani M. "Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system", *Hum Mol Genet*, Vol. 6, 1997, 1961–1971.
33. Liu Q & Dreyfuss G. "A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein", *EMBO J*. Vol. 15, 1996, pp. 3555–3565.
34. Young PJ, Le TT, Dunckley M, Nguyen TM, Burghes AH, Morris GE. "Nuclear gems and Cajal (coiled) bodies in fetal tissues: nucleolar distribution of the spinal muscular atrophy protein, SMN", *Exp. Cell Res*. Vol. 265, 2001, pp. 252–261.
35. Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE. "The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding", *Hum Mol Genet*. Vol. 9, no. 19, 2000, pp. 2869-2877.
36. Carvalho T, Almeida F, Calapez A, Lafarga M, Berciano MT, Carmo-Fonseca M. "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN: a link between snRNP biogenesis and the Cajal (coiled) body", *J. Cell Biol*. Vol. 147, 1999, pp. 715–728.
37. Matera AG & Frey MR. "Coiled bodies and gems: Janus or gemini?", *Am. J. Hum. Genet*. no. 63, 1998, pp. 317–321.
38. Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G. "The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins", *Cell*, Vol. 90, 1997, pp. 1013–1021.
39. Patrizi AL, Tiziano F, Zappata S, Donati MA, Neri G, Brahe C. "SMN protein analysis in fibroblast, amniocyte and CSV cultures from spinal muscular atrophy patients and its relevance for diagnosis", *Eur J Hum Genet*. Vol. 7, 1999, pp. 301-309.

40. Zhang HL, Pan F, Hong D, Shenoy SM, Singer RH, Bassell GJ. "Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon 7 in cytoplasmic localization", *J Neurosci.* no. 23, 2003, pp. 6627-6637.
41. Zhang H, Xing L, Rossoll W, Wichterle H, Singer RH, Bassell GJ. "Multiprotein complexes of the survival of motor neuron protein SMN with Gemins traffic to neuronal processes and growth cones of motor neurons", *J. Neurosci.* Vol. 26, 2006, pp. 8622-8632.
42. Rossoll W, Jablonka S, Andreassi C, Kröning AK, Karle K, Monani UR, Sendtner M. "Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of beta-actin mRNA in growth cones of motoneurons", *J. Cell Biol.* Vol. 163,2003, pp. 801-812.
43. Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ. "Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway", *Neurochem Int.* Vol. 45, no. 7, 2004, pp. 1107-1112.
44. Eggert C, Chari A, Laggerbauer B, Fischer U. "Spinal muscular atrophy: the RNP connection", *Trends Mol. Med.* Vol. 12, 2006, pp. 113-121.
45. Pellizzoni, L. "Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease", *EMBO Rep.* Vol. 8, 2007, pp. 340-345.
46. Gubitza AK, Feng W, Dreyfuss G. "The SMN complex", *Exp. Cell Res.* Vol. 296, 2004, pp. 51-56.
47. Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G. "Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly", *Science*, Vol. 298, 2002, pp. 1775-1779.
48. Meister G, Eggert C, Bühler D, Brahms H, Kambach C, Fischer U. "Methylation of Sm proteins by a complex containing PRMT5 and the putative U snRNP assembly factor pICln", *Curr. Biol.* Vol. 11, 2001, pp. 1990-1994.
49. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G. "The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis", *Cell*, Vol. 90, 1997, pp. 1023-1029.
50. Ogawa C, Usui K, Ito F, Itoh M, Hayashizaki Y, Suzuki H. "Role of survival motor neuron complex components in small nuclear ribonucleoprotein assembly", *J. Biol. Chem.* Vol. 284, 2009, 14609-14617.

51. Burghes AH & Beattie CE. "Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick?", *Nat Rev Neurosci*. Vol. 10, no. 8, 2009, pp. 597-609.
52. Raker VA, Hartmuth K, Kastner B, Lührmann R. "Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner", *Mol. Cell. Biol.* Vol. 19, 1999, pp. 6554–6565.
53. Meister G, Bühler D, Lagerbauer B, Zobawa M, Lottspeich F, Fischer U. "Characterization of a nuclear 20S complex containing the survival of motor neurons (SMN) protein and a specific subset of spliceosomal Sm proteins", *Hum. Mol. Genet.* Vol. 9, 2000, pp. 1977–1986.
54. Otter S, Grimm M, Neuenkirchen N, Chari A, Sickmann A, Fischer U. "A comprehensive interaction map of the human survival of motor neuron (SMN) complex", *J. Biol. Chem.* Vol. 282, 2007, pp. 5825–5833.
55. Carissimi C, Saieva L, Gabanella F, Pellizzoni L. "Gemin8 is required for the architecture and function of the survival motor neuron complex", *J. Biol. Chem.* Vol. 281, 2006, pp. 37009–37016.
56. Meister G, Eggert C, Fischer U. "SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story", *Trends Cell Biol.* Vol. 12, 2002, 472–478.
57. Pu WT, Krapivinsky GB, Krapivinsky L, Clapham DE. "pICln inhibits snRNP biogenesis by binding core spliceosomal proteins", *Mol. Cell. Biol.* Vol. 19, 1999, pp. 4113–4120.
58. Friesen WJ, Paushkin S, Wyce A, Massenet S, Pesiridis GS, Van Duyne G, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. "The methylosome, a 20S complex containing JBP1 and pICln, produces dimethylarginine-modified Sm proteins", *Mol. Cell. Biol.* Vol. 21, 2001, pp. 8289–300.
59. Chari A, Golas MM, Klingenhäger M, Neuenkirchen N, Sander B, Englbrecht C, Sickmann A, Stark H, Fischer U. "An assembly chaperone collaborates with the SMN complex to generate spliceosomal snRNPs" *Cell* Vol. 135, 2008, pp. 497–509.
60. Battle DJ, Lau CK, Wan L, Deng H, Lotti F, Dreyfuss G. "The Gemin5 protein of the SMN complex identifies snRNAs", *Mol. Cell* Vol. 23, 2006, pp. 273–279.

61. Shpargel KB & Matera AG. "Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins", *Proc. Natl Acad. Sci. USA* Vol. 102, 2005, pp. 17372–17377.
62. Narayanan U, Ospina JK, Frey MR, Hebert MD, Matera AG. "SMN, the spinal muscular atrophy protein, forms a pre-import snRNP complex with snurportin1 and importin  $\beta$ ", *Hum. Mol. Genet.* Vol. 11, 2002, pp. 1785–1795.
63. Terns MP & Terns R. M. "Macromolecular complexes: SMN—the master assembler", *Curr. Biol.* Vol. 11, 2001, pp. R862–R864.
64. Brahms H, Meheus L, de Brabandere V, Fischer U, Lührmann R. "Symmetrical dimethylation of arginine residues in spliceosomal Sm protein B/B' and the Sm-like protein LSM4, and their interaction with the SMN protein", Vol. 7, 2001, pp. 1531–1542.
65. Khusial P, Plaag R, Zieve G. W. "LSm proteins form heptameric rings that bind to RNA via repeating motifs", *Trends Biochem. Sci.* Vol. 30, 2005, pp. 522–528.
66. He W & Parker R. "Functions of LSm proteins in mRNA degradation and splicing", *Curr. Opin. Cell Biol.* Vol. 12, 2000, pp. 346–350.
67. Kiss T. "Biogenesis of small nuclear RNPs", *J. Cell Sci.* Vol. 117, 2004, pp. 5949–5951.
68. Pillai RS, Grimmler M, Meister G, Will CL, Lührmann R, Fischer U, Schümperli D. "Unique Sm core structure of U7 snRNPs: assembly by a specialized SMN complex and the role of a new component, LSM11, in histone RNA processing", *Genes Dev.* Vol. 17, 2003, pp. 2321–2333.
69. Rossoll W, Kröning AK, Ohndorf UM, Steegborn C, Jablonka S, Sendtner M. "Specific interaction of SMN, the spinal muscular atrophy determining gene product, with hnRNP-R and gry-rbp/hnRNP-Q: a role for SMN in RNA processing in motor axons?", *Hum. Mol. Genet.* Vol. 11, 2002, pp. 93–105.
70. Gu W, Pan F, Zhang H, Bassell GJ, Singer RH. "A predominantly nuclear protein affecting cytoplasmic localization of  $\beta$ -actin mRNA in fibroblasts and neurons", *J. Cell Biol.* Vol. 156, 2002, pp. 41–51.
71. Gabanella F, Carissimi C, Usiello A, Pellizzoni L. "The activity of the spinal muscular atrophy protein is regulated during development and cellular differentiation" *Hum. Mol. Genet.* Vol. 14, 2005, pp. 3629–3642.



72. McWhorter ML, Monani UR, Burghes AH, Beattie CE. "Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding", *J Cell Biol*, Vol. 162, 2003, pp. 919–931.
73. Winkler C, Eggert C, Gradl D, Meister G, Giegerich M, Wedlich D, Lagerbauer B, Fischer U. "Reduced U snRNP assembly causes motor axon degeneration in an animal model for spinal muscular atrophy", *Genes Dev*. Vol. 19, 2005, pp. 2320–2330.
74. Pellizzoni L., Kataoka N., Charroux B., Dreyfuss G., "A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing", *Cell*, Vol. 95, no. 5, 1998, pp. 615-624.
75. Fan L., Simard L.R., "Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development", *Human Molecular Genetics*, Vol. 11, no. 14, 2002, pp. 1606-1614.
76. Sharma A., Lambrechts A., Hao le T., Le T.T., Sewry C.A., Ampe C., Burghes A.H., Morris G.E., "A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells", *Experimental Cell Research*, Vol. 309, no. 1, 2005, pp. 185-197.
77. Chan YB, Miguel-Aliaga I, Franks C, Thomas N, Trülzsch B, Sattelle DB, Davies KE, van den Heuvel M. "Neuromuscular defects in a Drosophila survival motor neuron gene mutant", *Hum Mol Genet*, Vol. 12, 2003, pp. 1367–1376 (2003)
78. Frugier T., Tiziano F.D., Cifuentes-Diaz C., Miniou P., Roblot N., Dierich A., Le Meur M., Melki J., "Nuclear targeting defect of SMN lacking the C-terminus in a mouse model of spinal muscular atrophy", *Human Molecular Genetics*, Vol. 9, no. 5, 2000, pp. 849-858.
79. Monani U.R., Sendtner M., Coovert D.D., Parsons D.W., Andreassi C., Le T.T., Jablonka S., Schrank B., Rossol W., Prior T.W., Morris G.E., Burghes A.H., "The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in Smn(-/-) mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy", *Human Molecular Genetics*, Vol. 9, no. 3, 2000, pp. 333-339.
80. Lee T.T., Pham L.T., Butchbach M.E., Zhang H.L., Monani U.R., Coovert D.D., Gavrilina T.O., Xing L., Bassell G.J., Burghes A.H., "SMNDelta7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends

survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with full-length SMN”, *Human Molecular Genetics*, Vol. 14, 2005, pp. 845-857.

81. Sendtner M. “Therapy development in spinal muscular atrophy. *Nat Neurosci*”, Vol. 7, 2010, pp. 795-799.

82. Mercuri E, Bertini E, Messina S, Solari A, D'Amico A, Angelozzi C, Battini R, Berardinelli A, Boffi P, Bruno C, Cini C, Colitto F, Kinali M, Minetti C, Mongini T, Morandi L, Neri G, Orcesi S, Pane M, Pelliccioni M, Pini A, Tiziano FD, Villanova M, Vita G, Brahe C. “Randomized, double-blind, placebo-controlled trial of phenylbutyrate in spinal muscular atrophy”, *Neurology*, Vol. 68, no. 1, 2007, pp. 51-55

83. Swoboda KJ, Scott CB, Reyna SP, Prior TW, LaSalle B, Sorenson SL, Wood J, Acsadi G, Crawford TO, Kissel JT, Krosschell KJ, D'Anjou G, Bromberg MB, Schroth MK, Chan GM, Elsheikh B, Simard LR. “Phase II open label study of valproic acid in spinal muscular atrophy”, *PLoS One*, Vol. 4, no. 5, 2009, pp. 5268.

84. Avila AM, Burnett BG, Taye AA, Gabanella F, Knight MA, Hartenstein P, Cizman Z, Di Prospero NA, Pellizzoni L, Fischbeck KH, Sumner CJ. “Trichostatin A increases SMN expression and survival in a mouse model of spinal muscular atrophy”, *J Clin Invest.*, Vol. 117, no. 3, 2007, pp. 659-671.

85. Garbes L, Riessland M, Hölker I, Heller R, Hauke J, Tränkle C, Coras R, Blümcke I, Hahnen E, Wirth B. “LBH589 induces up to 10-fold SMN protein levels by several independent mechanisms and is effective even in cells from SMA patients non-responsive to valproate”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 18, no. 19, 2009, pp. 3645-58.

86. Riessland M, Ackermann B, Förster A, Jakubik M, Hauke J, Garbes L, Fritzsche I, Mende Y, Blumcke I, Hahnen E, Wirth B. “SAHA ameliorates the SMA phenotype in two mouse models for spinal muscular atrophy”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 19, no. 8, 2010, pp. 1492-506.

87. Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdóttir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andrésón T, Zhang J, Edwards JD, Simard LR, Pellizzoni L, Jarecki J, Burghes AH, Gurney ME. “Effects of 2,4-diaminoquinazoline derivatives on SMN expression and phenotype in a mouse model for spinal muscular atrophy”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 19, no. 3, 2010, pp. 454-467.

88. Jarecki J., Chen X., Bernardino A., Coovert D.D., Whitney M., Burghes A., Stack J., Pollok B.A., “Diverse small-molecule modulators of SMN expression found by high-throughput compound screening: early leads towards a

therapeutic for spinal muscular atrophy”, *Human Molecular Genetics*, Vol. 14, no. 14, 2005, pp. 2003–2018.

89. Thurmond J, Butchbach ME, Palomo M, Pease B, Rao M, Bedell L, Keyvan M, Pai G, Mishra R, Haraldsson M, Andresson T, Bragason G, Thosteinsdottir M, Bjornsson JM, Coovert DD, Burghes AH, Gurney ME, Singh J. “Synthesis and biological evaluation of novel 2,4-diaminoquinazoline derivatives as SMN2 promoter activators for the potential treatment of spinal muscular atrophy”, *J Med Chem*. Vol. 51, no. 3, 2008, pp. 449-469.

90. Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F. “Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts”, *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol. 100, no. 7, 2003, pp. 4114-4119.

91. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR. “Enhancement of SMN2 exon 7 inclusion by antisense oligonucleotides targeting the exon”, *PLoS Biol.*, Vol. 5, no. 4, 2007, pp. 73.

92. Grzeschik SM, Ganta M, Prior TW, Heavlin WD, Wang CH. “Hydroxyurea enhances SMN2 gene expression in spinal muscular atrophy cells”, *Ann Neurol*. Vol. 58, no. 2, 2005, pp. 194-202.

93. Wolstencroft EC, Mattis V, Bajer AA, Young PJ, Lorson CL. “A non-sequence-specific requirement for SMN protein activity: the role of aminoglycosides in inducing elevated SMN protein levels”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 14, no. 9, 2005, pp. 1199-210.

94. Heier CR & DiDonato CJ. “Translational readthrough by the aminoglycoside geneticin (G418) modulates SMN stability in vitro and improves motor function in SMA mice in vivo”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 18, no. 7, 2009, pp. 1310-1322.

95. Mattis VB, Ebert AD, Fosso MY, Chang CW, Lorson CL. “Delivery of a read-through inducing compound, TC007, lessens the severity of a spinal muscular atrophy animal model”, *Hum Mol Genet*. Vol. 18, no. 20, 2009, pp. 3906-3913.

96. Haddad H, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Roblot N, Joshi V, Melki J. “Riluzole attenuates spinal muscular atrophy disease progression in a mouse model”, *Muscle Nerve*, Vol. 28, no. 4, 2003, pp. 432-437.

97. Merlini L, Solari A, Vita G, Bertini E, Minetti C, Mongini T, Mazzoni E, Angelini C, Morandi L. “Role of gabapentin in spinal muscular atrophy: results

of a multicenter, randomized Italian study”, *J Child Neurol.*, Vol. 18, no. 8, 2003, pp. 537-541.

98. Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J. “Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy”, *Hum Mol Genet.*, Vol. 12, no. 11, 2003, pp. 1233-1239.

99. Bordet T, Buisson B, Michaud M, Drouot C, Galéa P, Delaage P, Akentieva NP, Evers AS, Covey DF, Ostuni MA, Lacapère JJ, Massaad C, Schumacher M, Steidl EM, Maux D, Delaage M, Henderson CE, Pruss RM. “Identification and characterization of cholest-4-en-3-one, oxime (TRO19622), a novel drug candidate for amyotrophic lateral sclerosis”, *J Pharmacol Exp Ther.*, Vol. 322, no. 2, 2007, pp. 709-720.

100. Angelozzi C, Borgo F, Tiziano FD, Martella A, Neri G, Brahe C. “Salbutamol increases SMN mRNA and protein levels in spinal muscular atrophy cells”, *J Med Genet.* Vol. 45, no. 1, 2008, pp. 29-31.

101. Flax JD, Aurora S, Yang C, Simonin C, Wills AM, Billingham LL, Jendoubi M, Sidman RL, Wolfe JH, Kim SU, Snyder EY. “Engraftable human neural stem cells respond to developmental cues, replace neurons, and express foreign genes”, *Nat Biotechnol.*, Vol. 16, no. 11, 1998, pp. 1033-1039.

102. Park KI, Lachyankar M, Nissim S, Snyder EY. “Neural stem cells for CNS repair: state of the art and future directions”, *Adv Exp Med Biol.* Vol. 506(Pt B), 2002, pp. 1291-1296.

103. Lee JP, Jeyakumar M, Gonzalez R, Takahashi H, Lee PJ, Baek RC, Clark D, Rose H, Fu G, Clarke J, McKercher S, Meerloo J, Muller FJ, Park KI, Butters TD, Dwek RA, Schwartz P, Tong G, Wenger D, Lipton SA, Seyfried TN, Platt FM, Snyder EY. “Stem cells act through multiple mechanisms to benefit mice with neurodegenerative metabolic disease”, *Nat Med.*, Vol. 13, no. 4, 2007, pp. 439-447.

104. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Donadoni C, Del Bo R, Crimi M, Bordoni A, Fortunato F, Strazzer S, Menozzi G, Salani S, Bresolin N, Comi GP. “Transplanted ALDHhiSSClo neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1”, *Hum Mol Genet.* Vol. 15, no. 2, 2006, pp. 167-187.

105. Corti S, Locatelli F, Papadimitriou D, Del Bo R, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Fortunato F, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. “Neural

stem cells LewisX+ CXCR4+ modify disease progression in an amyotrophic lateral sclerosis model”, *Brain*. Vol. 130, 2007, pp. 1289-1305.

106. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Saladino F, Bordoni A, Fortunato F, Del Bo R, Papadimitriou D, Locatelli F, Menozzi G, Strazzer S, Bresolin N, Comi GP. “Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy”, *J Clin Invest.*, Vol. 118, no. 10, 2008, pp. 3316-30.

107. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Del Bo R, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. “Motoneuron transplantation rescues the phenotype of SMARD1 (spinal muscular atrophy with respiratory distress type 1)”, *J Neurosci*. Vol. 29, no. 38, 2009, pp. 11761-11771.

108. Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, Simone C, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin N, Comi GP. “Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice”, *Brain*, Vol. 133(Pt 2), 2010, pp. 465-481.

109. Papadeas ST, Maragakis NJ. “Advances in stem cell research for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Curr Opin Biotechnol*”, Vol. 20, no. 5, 2009, pp. 545-551.

110. Mitalipov S & Wolf D. “Totipotency, pluripotency and nuclear reprogramming”, *Adv Biochem Eng Biotechnol.*, Vol.14, 2009, pp. 185-199.

111. Martin GR. “Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells”, *Proc Natl Acad Sci U S A*, Vol. 78, no. 12, 1981, pp. 7634-7638.

112. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. “Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts”, *Science* Vol. 282, 1998, pp. 1145–1147.

113. Smith AG, Heath JK, Donaldson DD, Wong GG, Moreau J, Stahl M, Rogers D. “Inhibition of pluripotential embryonic stem cell differentiation by purified polypeptides”, *Nature*, Vol. 15, no. 336(6200), 1988, pp. 688-690.

114. Williams RL, Hilton DJ, Pease S, Willson TA, Stewart CL, Gearing DP, Wagner EF, Metcalf D, Nicola NA, Gough NM. “Myeloid leukaemia inhibitory factor maintains the developmental potential of embryonic stem cells”, *Nature*, Vol. 15, no. 336(6200), 1988, pp. 684-687.

115. Nichols J, Evans EP, Smith AG. "Establishment of germ-line-competent embryonic stem (ES) cells using differentiation inhibiting activity", *Development*, Vol. 110, no. 4, 1990, pp. 1341-1348.
116. Wichterle H, Lieberam I, Porter JA, Jessell TM. "Directed differentiation of embryonic stem cells into motor neurons", *Cell*, Vol. 110, no. 3, 2002, pp. 385-397.
117. Barberi T, Klivenyi P, Calingasan NY, Lee H, Kawamata H, Loonam K, Perrier AL, Bruses J, Rubio ME, Topf N, Tabar V, Harrison NL, Beal MF, Moore MA, Studer L. "Neural subtype specification of fertilization and nuclear transfer embryonic stem cells and application in parkinsonian mice", *Nat Biotechnol.*, Vol. 21, no. 10, 2003, pp. 1200-1207.
118. Roy NS, Cleren C, Singh SK, Yang L, Beal MF, Goldman SA. "Functional engraftment of human ES cell-derived dopaminergic neurons enriched by coculture with telomerase-immortalized midbrain astrocytes", *Nat Med.*, Vol. 12, no. 11, 2006, pp. 1259-1268.
119. Watanabe K, Kamiya D, Nishiyama A, Katayama T, Nozaki S, Kawasaki H, Watanabe Y, Mizuseki K, Sasai Y. "Directed differentiation of telencephalic precursors from embryonic stem cells", *Nat Neurosci.*, Vol. 8, no. 3, 2005, pp. 288-296.
120. Gossrau G, Thiele J, Konang R, Schmandt T, Brüstle O. "Bone morphogenetic protein-mediated modulation of lineage diversification during neural differentiation of embryonic stem cells", *Stem Cells*, Vol. 25, no. 4, 2007, pp. 939-949.
121. Glaser T & Brüstle O. "Retinoic acid induction of ES-cell-derived neurons: the radial glia connection", *Trends Neurosci.*, Vol. 28, no. 8, 2005, pp. 397-400.
122. Nistor GI, Totoiu MO, Haque N, Carpenter MK, Keirstead HS. "Human embryonic stem cells differentiate into oligodendrocytes in high purity and myelinate after spinal cord transplantation", *Glia*, Vol. 49, no. 3, 2005, pp. 385-396.
123. Tsuchiya H, Harashima H, Kamiya H. "Increased SFHR gene correction efficiency with sense single-stranded DNA" *J Gene Med.*, Vol. 7, no. 4, 2005, pp. 486-493.

124. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, Nie J, Jonsdottir GA, Ruotti V, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells", *Science*, Vol. 318, 2007, pp. 1917–1920.
125. Okamoto K, Okazawa H, Okuda A, et al. A novel octamer binding transcription factor is differentially expressed in mouse embryonic cells. *Cell* 60, 461–472 (1990)
126. Schöler HR, Hatzopoulos AK, Balling R, Suzuki N, Gruss P. "A family of octamer-specific proteins present during mouse embryogenesis: evidence for germlinespecific expression of an Oct factor", *EMBO J.*, Vol. 8, 1989, pp. 2543–2550.
127. Niwa H, Miyazaki J, Smith AG. "Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells", *Nat. Genet.*, Vol. 24, 2000, pp. 372–376.
128. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A. "Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4", *Cell*, Vol. 95, 1998, pp. 379–391.
129. Zaehres H, Lensch MW, Daheron L, Stewart SA, Itskovitz-Eldor J, Daley GQ. "High-efficiency RNA interference in human embryonic stem cells", *Stem Cells*, Vol. 23, 2005, pp. 299–305.
130. Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R. "Multipotent cell lineages in early mouse development depend on Sox2 function", *Genes Dev.*, Vol. 17, 2003, pp. 126–140.
131. Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR. "Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference", *Nature*, Vol. 442, 2006, pp. 533–538.
132. Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H. "Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct3/4 expression in mouse embryonic stem cells", *Nat. Cell Biol.*, Vol. 9, 2007, pp. 625–635.

133. Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A. "Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells", *Cell* Vol. 113, 2003, pp. 643–655.
134. Mitsui K, Tokuzawa Y, Itoh H, Segawa K, Murakami M, Takahashi K, Maruyama M, Maeda M, Yamanaka S. "The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells", *Cell*, Vol. 113, 2003, pp. 631–642.
135. Hough SR, Clements I, Welch PJ, Wiederholt KA. "Differentiation of mouse embryonic stem cells after RNA interference-mediated silencing of Oct4 and Nanog", *Stem Cells*, Vol. 24, 2006, pp. 1467–1475.
136. Kuroda T, Tada M, Kubota H, Kimura H, Hatano SY, Suemori H, Nakatsuji N, Tada T. "Octamer and Sox elements are required for transcriptional cis regulation of Nanog gene expression", *Mol. Cell Biol.*, Vol. 25, 2005, pp. 2475–2485.
137. Rodda DJ, Chew JL, Lim LH, Loh YH, Wang B, Ng HH, Robson P. "Transcriptional regulation of Nanog by Oct4 and Sox2", *J. Biol. Chem.*, Vol. 280, 2005, pp. 24731–24737.
138. Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA. "Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells", *Cell*, Vol. 122, 2005, pp. 947–956.
139. Loh YH, Wu Q, Chew JL, Vega VB, Zhang W, Chen X, Bourque G, George J, Leong B, Liu J, Wong KY, Sung KW, Lee CW, Zhao XD, Chiu KP, Lipovich L, Kuznetsov VA, Robson P, Stanton LW, Wei CL, Ruan Y, Lim B, Ng HH. "The Oct4 and Nanog transcription network regulates pluripotency in mouse embryonic stem cells", *Nat. Genet.*, Vol. 38, 2006, pp. 431–440.
140. Adhikary S & Eilers M. "Transcriptional regulation and transformation by Myc proteins", *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, Vol. 6, 2005, pp. 635–645.
141. Knoepfler PS, Zhang XY, Cheng PF, Gafken PR, McMahon SB, Eisenman RN. "Myc influences global chromatin structure", *EMBO J.* Vol. 25, 2006, pp. 2723–2734.
142. O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT. "c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression", *Nature*, Vol. 435, 2005, pp. 839–843.



143. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. "The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene", *Nat. Cell Biol.*, Vol. 7, 2005, pp. 1074–1082.
144. Nakatake Y, Fukui N, Iwamatsu Y, Masui S, Takahashi K, Yagi R, Yagi K, Miyazaki J, Matoba R, Ko MS, Niwa H. "Klf4 cooperates with Oct3/4 and Sox2 to activate the Lefty1 core promoter in embryonic stem cells", *Mol. Cell Biol.*, Vol. 26, 2006, pp. 7772–7782.
145. Richards M, Tan SP, Tan JH, et al. The transcriptome profile of human embryonic stem cells as defined by SAGE. *Stem Cells*.22(1):51-64 (2004)
146. Jaenisch R & Young R. "Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming", *Cell*, Vol. 132, no. 4, 2008, pp. 567-582.
147. Takahashi K, Yamanaka S. "Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors", *Cell*, Vol. 126, 2006, pp. 663–676.
148. Yamanaka S. "Strategies and new developments in the generation of patient-specific stem cells", *Cell Stem Cell*, Vol. 1, 2007, pp. 39–49.
149. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, Yamanaka S. "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factor" *Cell*, Vol. 131, 2007, pp. 861–872.
150. Park IH, Zhao R, West JA, Yabuuchi A, Huo H, Ince TA, Lerou PH, Lensch MW, Daley GQ. "Reprogramming of human somatic cells to pluripotency with defined factors", *Nature*, Vol. 451, 2008, pp. 141–146.
151. Aasen T, Raya A, Barrero MJ, Garreta E, Consiglio A, Gonzalez F, Vassena R, Bilić J, Pekarik V, Tiscornia G, Edel M, Boué S, Izpisua Belmonte JC. "Efficient and rapid generation of induced pluripotent stem cells from human keratinocytes", *Nature Biotechnol.*, Vol. 26, 2008, pp. 1276–1284.
152. Yu J, Hu K, Smuga-Otto K, Tian S, Stewart R, Slukvin II, Thomson JA. "Human induced pluripotent stem cells free of vector and transgene sequences", *Science*, Vol. 324, no. 5928, 2009, pp. 797-801.
153. Ebert AD, Yu J, Rose FF Jr, Mattis VB, Lorson CL, Thomson JA, Svendsen CN. "Induced pluripotent stem cells from a spinal muscular atrophy patient", *Nature*, Vol. 457, no. 7227, 2009, pp. 277-280.

154. Azzouz M, Le T, Ralph GS, Walmsley L, Monani UR, Lee DC, Wilkes F, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Burghes AH, Mazarakis ND. "Lentivector-mediated SMN replacement in a mouse model of spinal muscular atrophy", *J Clin Invest.* Vol. 114, no. 12, 2004, pp. 1726-1731.
155. Passini MA, Bu J, Roskelley EM, Richards AM, Sardi SP, O'Riordan CR, Klinger KW, Shihabuddin LS, Cheng SH. "CNS-targeted gene therapy improves survival and motor function in a mouse model of spinal muscular atrophy", *J Clin Invest.*, Vol. 120, no. 4, 2010, pp. 1253-1264.
156. Foust KD, Nurre E, Montgomery CL, Hernandez A, Chan CM, Kaspar BK. "Intravascular AAV9 preferentially targets neonatal neurons and adult astrocytes", *Nat Biotechnol.*, Vol. 27, no. 1, 2009, pp. 59-65.
157. Mackenzie A. "Genetic therapy for spinal muscular atrophy. *Nat Biotechnol.*", Vol. 28, no. 3, 2010, pp. 235-237.
158. DiMatteo D, Callahan S, Kmiec EB. "Genetic conversion of an SMN2 gene to SMN1: a novel approach to the treatment of spinal muscular atrophy", *Exp Cell Res.*, Vol. 314, 2008, pp. 878-886.
159. Parekh-Olmedo H, Ferrara L, Brachman E, Kmiec EB. "Gene therapy progress and prospects: targeted gene repair", *Gene Therapy*, Vol. 12, 2005, 639-646.
160. IR, Beattie SG, Hill VJ, Dickson G. "Oligonucleotide-based gene correction strategies: applications to neuromuscular and cardiovascular diseases", *Croat Med J.*, Vol. 42, no. 4, 2001, pp. 467-472.
161. Chamberlain JR, Schwarze U, Wang PR, Hirata RK, Hankenson KD, Pace JM, Underwood RA, Song KM, Sussman M, Byers PH, Russell DW. "Gene targeting in stem cells from individuals with osteogenesis imperfecta", *Science*, Vol. 303, no. 5661, 2004, pp. 1198-1201.
162. Gruenert DC, Bruscia E, Novelli G, Colosimo A, Dallapiccola B, Sangiuolo F, Goncz KK. "Sequence-specific modification of genomic DNA by small DNA fragments", *J Clin Invest.*, Vol. 112, no. 5, 2003, pp. 637-641.
163. Leclerc X, Danos O, Scherman D, Kichler A. "A comparison of synthetic oligodeoxynucleotides, DNA fragments and AAV-1 for targeted episomal and chromosomal gene repair", *BMC Biotechnol*, Vol. 9, 2009, pp. 35.
164. Lonkar P, Kim KH, Kuan JY, Chin JY, Rogers FA, Knauert MP, Kole R, Nielsen PE, Glazer PM. "Targeted correction of a thalassemia-associated

beta-globin mutation induced by pseudo-complementary peptide nucleic acids”, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 37, no. 11, 2009, pp. 3635-3644.

165. Maguire K, Suzuki T, DiMatteo D, Parekh-Olmedo H, Kmiec E. “Genetic correction of splice site mutation in purified and enriched myoblasts isolated from mdx5cv mice”, *BMC Mol Biol.*, Vol. 10, 2009, pp. 15.

166. Alexeev V & Yoon K. “Stable and inheritable changes in genotype and phenotype of albino melanocytes induced by an RNA-DNA oligonucleotide”, *Nat Biotechnol.*, Vol. 16, no. 13, 1998, pp. 1343-1346.

167. Ciavatta VT, Padove SA, Boatright JH, Nickerson JM. “Mouse retina has oligonucleotide-induced gene repair activity”, *Invest Ophthalmol Vis Sci.*, Vol. 46, no. 7, 2005, pp. 2291-2299.

168. Kren BT, Bandyopadhyay P, Steer CJ. “In vivo site-directed mutagenesis of the factor IX gene by chimeric RNA/DNA oligonucleotides”, *Nat Med.*, Vol. 4, no. 3, 1998, pp. 285-290.

169. Colosimo A, Goncz KK, Novelli G, Dallapiccola B, Gruenert DC. “Targeted correction of a defective selectable marker gene in human epithelial cells by small DNA fragments”, *Mol Ther.* Vol. 3, no. 2, 2001, pp. 178-185.

170. Deng C & Capecchi MR. “Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus”, *Mol Cell Biol.*, Vol. 12, no. 8, 1992, pp. 3365-3371.

171. Kunzelmann K, Legendre JY, Knoell DL, Escobar LC, Xu Z, Gruenert DC. “Gene targeting of CFTR DNA in CF epithelial cells”, *Gene Ther.*, Vol. 3, no. 10, 1996, pp. 859-867.

172. Morrison C & Wagner E. “Extrachromosomal recombination occurs efficiently in cells defective in various DNA repair systems”, *Nucleic Acids Res.*, Vol. 24, no. 11, 1996, pp. 2053-2058.

173. Alexeev V, Igoucheva O, Yoon K. “Simultaneous targeted alteration of the tyrosinase and c-kit genes by single-stranded oligonucleotides”, *Gene Ther.*, Vol. 9, no. 24, 2002, pp. 1667-1675.

174. Campbell CR, Keown W, Lowe L, Kirschling D, Kucherlapati R. “Homologous recombination involving small single-stranded oligonucleotides in human cells”, *New Biol.*, Vol. 1, no. 2, 1989, pp. 223-227.

175. Igoucheva O, Alexeev V, Yoon K. "Targeted gene correction by small single-stranded oligonucleotides in mammalian cells", *Gene Ther.* Vol. 8, no. 5, 2001, pp. 391-399.
176. Cole-Strauss A, Gamper H, Holloman WK, Muñoz M, Cheng N, Kmiec EB. "Targeted gene repair directed by the chimeric RNA/DNA oligonucleotide in a mammalian cell-free extract", *Nucleic Acids Res.*, Vol. 27, no. 5, pp. 1323-1330.
177. Rando TA, Disatnik MH, Zhou LZ. "Rescue of dystrophin expression in mdx mouse muscle by RNA/DNA oligonucleotides", *Proc Natl Acad Sci USA*, Vol. 97, no. 10, 2000, pp. 5363-5368.
178. Tran ND, Liu X, Yan Z, Abbote D, Jiang Q, Kmiec EB, Sigmund CD, Engelhardt JF. "Efficiency of chimeraplast gene targeting by direct nuclear injection using a GFP recovery assay", *Mol Ther.*, Vol. 7, no. 2, 2003, pp. 248-253.
179. Seidman MM & Glazer PM. "The potential for gene repair via triple helix formation", *J Clin Invest.*, Vol. 112, no. 4, 2003, pp. 487-494.
180. Vasquez KM, Narayanan L, Glazer PM. "Specific mutations induced by triplex-forming oligonucleotides in mice", *Science*, Vol. 290, no. 5491, 2000, pp. 530-533.
181. Leclerc X, Danos O, Scherman D, Kichler A. "A comparison of synthetic oligodeoxynucleotides, DNA fragments and AAV-1 for targeted episomal and chromosomal gene repair", *BMC Biotechnol.*, Vol. 9, 2009, pp. 35.
182. Murphy BR, Moayedpardazi HS, Gewirtz AM, Diamond SL, Pierce EA. "Delivery and mechanistic considerations for the production of knock-in mice by single-stranded oligonucleotide gene targeting", *Gene Therapy*, Vol. 14, 2007, pp. 304-315.
183. Parekh-Olmedo, H. & Kmiec, E.B. "Progress and prospects: targeted gene alteration (TGA)", *Gene Ther.*, Vol. 14, 2007, pp. 1675-1680.
184. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons", *Science*, Vol. 321, no. 5893, 2008, pp. 1218-1221.

185. van der Steege G, Grootsholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CH. "PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy", *Lancet*, Vol. 345, 1995, pp. 985-986.
186. Andreassi C, Angelozzi C, Tiziano FD, Vitali T, De Vincenzi E, Boninsegna A, Villanova M, Bertini E, Pini A, Neri G, Brahe C. "Phenylbutyrate increases SMN expression in vitro: relevance for treatment of spinal muscular atrophy", *Eur. J. Hum. Genet.*, Vol. 12, 2004, pp. 59-65.
187. Hu B.Y. & Zhang S.C. "Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells", *Nat. Protoc.*, Vol. 4, 2009, pp. 1295-1304.
188. Wada T, Honda M, Minami I, Tooi N, Amagai Y, Nakatsuji N, Aiba K. "Highly efficient differentiation and enrichment of spinal motor neurons derived from human and monkey embryonic stem cells", *PLoS One*. Vol. 4, no. 8, 2009, pp. 6722.
189. Valori CF, Ning K, Wyles M, Mead RJ, Grierson AJ, Shaw PJ, Azzouz M. "Systemic delivery of scAAV9 expressing SMN prolongs survival in a model of spinal muscular atrophy", *Sci. Transl. Med.*, Vol. 2, 2010, pp. 35-42.
190. Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G. "SMN deficiency causes tissue-specific perturbations in the repertoire of snRNAs and widespread defects in splicing", *Cell*, Vol. 133, 2008, pp. 585-600.
191. Dominguez E, Marais T, Chatauret N, Benkhalifa-Ziyyat S, Duque S, Ravassard P, Carcenac R, Astord S, Pereira de Moura A, Voit T, Barkats M. "Intravenous scAAV9 delivery of a codon-optimized SMN1 sequence rescues SMA mice", *Hum. Mol. Genet.*, Vol. 20, 2011, pp. 681-693.
192. Dimos JT, Rodolfa KT, Niakan KK, Weisenthal LM, Mitsumoto H, Chung W, Croft GF, Saphier G, Leibel R, Goland R, Wichterle H, Henderson CE, Eggan K. "Induced pluripotent stem cells generated from patients with ALS can be differentiated into motor neurons", *Science*, Vol. 321, 2008, pp. 1218-1221.
193. Gingras M, Gagnon V, Minotti S, Durham HD, Berthod F. "Optimized protocols for isolation of primary motor neurons, astrocytes and microglia from embryonic mouse spinal cord", *J Neurosci Methods* Vol. 163, 2007, pp. 111-118.

194. Stadtfeld M. & Hochedlinger K. "Induced pluripotency: history, mechanisms, and applications", *Genes Dev.*, Vol. 24, 2010, pp. 2239-2263.
195. Foust KD, Wang X, McGovern VL, Braun L, Bevan AK, Haidet AM, Le TT, Morales PR, Rich MM, Burghes AH, Kaspar BK. "Rescue of the spinal muscular atrophy phenotype in a mouse model by early postnatal delivery of SMN", *Nat. Biotechnol.*, Vol. 28, 2010, pp. 271-274.
196. Goncz KK, Prokopishyn NL, Abdolmohammadi A, Bedayat B, Maurisse R, Davis BR, Gruenert DC. "Small fragment homologous replacement-mediated modification of genomic beta-globin sequences in human hematopoietic stem/progenitor cells", *Oligonucleotides*, Vol. 16, no. 3, 2006, pp. 213-224.
197. Son, E.Y.; Ichida, J.K.; Wainger, B.J.; Toma, J.S.; Rafuse, V.F.; Woolf, C.J.; Eggan, K. "Conversion of mouse and human fibroblasts into functional spinal motor neurons", *Cell Stem Cell*, Vol. 9, 2011, pp. 205–218.
198. Suzuki M., Svendsen C.N. "Combining growth factor and stem cell therapy for amyotrophic lateral sclerosis", *Trends in Neuroscience*, Vol. 31, no. 4, 2008, pp. 192-198.

## PUBBLICAZIONI

Articoli scientifici pubblicati su riviste internazionali durante il periodo di dottorato.

- Corti S, Nizzardo M, **Simone C**, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Salani S, Donadoni C, Riboldi G, Menozzi G, Bonaglia C, Bresolin N, and Comi GP. "Native and disease-corrected motor neurons from human spinal muscular atrophy-induced pluripotent stem cells free of vector and transgenic sequences as a model and cell source for transplantation". *Submitted to science translational medicine*.
- Nizzardo M, **Simone C**, Falcone M, Riboldi G, Comi GP, Bresolin N, Corti S. "Direct reprogramming of adult somatic cells into other lineages: past evidence and future perspectives". *Submitted to Cell Transplantation*. Review.
- Nizzardo M, **Simone C**, Falcone M, Riboldi G, Rizzo F, Magri F, Bresolin N, Comi GP, Corti S. "Research advances in gene therapy approaches for the treatment of amyotrophic lateral sclerosis". *In press, Cellular and Molecular Life Science*.
- Riboldi G, Nizzardo M, **Simone C**, Falcone M, Bresolin N, Comi GP, Corti S. ALS genetic modifiers that increase survival of SOD1 mice and are suitable for therapeutic development. *Prog. Neurobiol.* Vol. 95, no. 2, 2011, pp. 133-48.
- Nizzardo M, Nardini M, Ronchi D, Salani S, Donadoni C, Fortunato F, Colciago G, Falcone M, **Simone C**, Riboldi G, Govoni A, Bresolin N, Comi GP, and Corti S. "Beta-lactam antibiotic offer neuroprotection in a spinal muscular atrophy mouse model by multiple mechanisms". *Exp Neurol.* Vol. 229, no. 2, 2011, pp. 214-225.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, **Simone C**, Falcone M, Riboldi G, Govoni A, Bresolin N, Comi GP. "Systemic transplantation of c-kit+ cells exerts a therapeutic effect in a model of amyotrophic lateral sclerosis". *Hum Mol Genet.* Vol. 19, no. 19, 2010, pp. 3782-3796.
- Nizzardo M, **Simone C**, Falcone M, Locatelli F, Riboldi G, Comi GP, Corti S. "Human motor neuron generation from embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells". *Cell Mol Life Sci.* Vol. 67, no. 22, 2010, pp. 3837-3847.
- Corti S, Nizzardo M, Nardini M, Donadoni C, Salani S, Ronchi D, **Simone C**, Falcone M, Papadimitriou D, Locatelli F, Mezzina N, Gianni F, Bresolin

---

PUBBLICAZIONI

---

N, Comi GP. "Embryonic stem cell-derived neural stem cells improve spinal muscular atrophy phenotype in mice", *Brain*, Vol. 133, 2010, pp. 465-481.