



UNIVERSITÀ DI PISA

**DOTTORATO DI RICERCA IN
MORFOLOGIA E FUNZIONE NORMALE E PATOLOGICA
DI CELLULE E TESSUTI**

PRESIDENTE

Chiar.mo Prof. Antonio Paparelli

**STUDIO MORFOLOGICO E COMPORTAMENTALE DI
UN MODELLO SPERIMENTALE DI ATROFIA
MUSCOLARE SPINALE (SMA)**

CANDIDATO

Luca Toti

RELATORE

Dott.ssa Michela Ferrucci

SSD BIO/16

Ciclo 2008/2010

INDICE

ABSTRACT	1
INTRODUZIONE	3
1. ATROFIA MUSCOLARE SPINALE	3
1.1 <i>LA MALATTIA</i>	3
1.2 <i>BASI GENETICHE DELLA SMA</i>	8
1.3 <i>LA PROTEINA SMN</i>	16
1.4 <i>MECCANISMI PATOGENETICI DELLA SMA</i>	22
2. MODELLI ANIMALI DI SMA	24
2.1 <i>I LIEVITI COME MODELLO EUCARIOTICO UNICELLULARE DI SMA</i>	25
2.2 <i>MODELLI DI SMA NEGLI INVERTEBRATI: NEMATODI (CAENORHABDITIS ELEGANS)</i>	25
2.3 <i>MODELLI DI SMA NEGLI INVERTEBRATI: ARTROPODI (DROSOPHILA MELANOGASTER)</i>	26
2.3 <i>MODELLI DI SMA NEI VERTEBRATI: PESCI (ZEBRAFISH)</i>	27
2.4 <i>MODELLI DI SMA NEI VERTEBRATI: RODITORI (TOPO)</i>	29
INTRODUZIONE ALLO STUDIO	34
1. MODELLO MURINO SMNA2G^{+/-};SMN2^{+/+};SMN^{-/-}	35
2. LITIO E NEUROPROTEZIONE	36
SCOPO DELLO STUDIO	41
MATERIALI E METODI	43
1. GRUPPI SPERIMENTALI E TRATTAMENTI FARMACOLOGICI	43
2. ANALISI COMPORTAMENTALE	44
2.1 <i>HIND LIMB EXTENSION REFLEX</i>	44
2.2 <i>EQUILIBRIUM TEST</i>	45
2.3 <i>STRIDE LENGHT TEST</i>	45
2.4 <i>PAW GRIP ENDURANCE TEST</i>	46

2.5	<i>ROTAROD TEST</i>	46
2.6	<i>TILTING TEST</i>	46
2.7	<i>ANALISI DEL TREMORE</i>	47
2.	SACRIFICIO E PROCESSAZIONE DEL MIDOLLO SPINALE PER L'ANALISI IN MICROSCOPIA OTTICA	48
3.	ANALISI MORFOLOGICA	49
4.	ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA	54
	RISULTATI	55
1.	CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO MURINO DI SMA III	55
1.1	<i>ALTERAZIONI MOTORIE NEL TOPO SMA III</i>	55
1.2	<i>ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE E MORFOMETRICHE NEL MIDOLLO SPINALE DEL TOPO SMA III</i>	58
1.3	<i>IMMUNOPOSITIVITÀ PER LA PROTEINA SMN</i>	64
2.	VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL LITIO SUL MODELLO MURINO DI SMA III	65
2.1	<i>IL LITIO RITARDA L'INSORGENZA DEI DEFICIT MOTORI NEL TOPO SMA III</i>	65
2.2	<i>IL LITIO ATTENUA LE ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE E MORFOMETRICHE NEL MIDOLLO SPINALE DEL TOPO SMA III</i>	69
2.3	<i>IL LITIO MODIFICA L'IMMUNOPOSITIVITÀ PER LA PROTEINA SMN NEL TOPO SMA III</i>	74
	DISCUSSIONE	76
	BIBLIOGRAFIA	87

ABSTRACT

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una comune patologia neuromuscolare di origine autosomica recessiva, dovuta alla mutazione del gene *SMN1* che codifica per la proteina Survival of Motor Neuron (SMN). Essa è caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni del corno anteriore del midollo spinale, che porta a paralisi progressiva e a morte. In base all'insorgenza, alla gravità e alla durata di malattia, la SMA si può suddividere in tre tipi: tipo I (grave); tipo II (intermedio); tipo III (leggero). Il fenotipo clinico della malattia è correlato ai livelli di espressione della proteina SMN. I modelli animali di SMA, con genotipo caratterizzato dalla delezione del gene *Smn* murino e dall'espressione di specifici transgeni umani, mostrano una sintomatologia motoria paragonabile a quella umana e differiscono per la sopravvivenza, da pochi giorni fino a diversi mesi.

Allo scopo di indagare i meccanismi istopatologici che accompagnano la degenerazione dei motoneuroni nella SMA, durante il corso di dottorato è stato studiato un modello murino di SMA di tipo III con genotipo *SMNA2G^{+/-}; SMN2^{+/+}; Smn^{-/-}*. In particolare, la prima parte dello studio è stata dedicata a caratterizzare, dal punto di vista comportamentale e morfologico, il modello murino di SMA III. Di questo nuovo modello è stata fornita una descrizione dettagliata sia della insorgenza e della progressione di malattia, valutata attraverso adeguati test motori, che della neuropatologia, attraverso l'analisi sistematica del midollo spinale condotta al microscopio ottico con un rigoroso metodo stereologico. Nella seconda parte dello studio è stata valutata l'efficacia neuroprotettiva di un trattamento terapeutico di tipo farmacologico, basato sulla somministrazione cronica di sali di litio (1 mEq/Kg a giorni alterni), che è risultato promettente in altre patologie neurodegenerative.

Lo studio dimostra che nel topo SMA III la progressiva compromissione di funzioni motorie è accompagnata dalla selettiva perdita dei motoneuroni nel midollo spinale e da alterazioni della morfologia (forma e le dimensioni) e della localizzazione (eterotopia) dei motoneuroni. L'indagine immunoistochimica mostra inoltre che la distribuzione intracellulare della proteina SMN risulta profondamente alterata nel topo SMA III. Risultati preliminari indicano che il trattamento cronico con litio è in grado di contrastare tutte le principali alterazioni documentate in questo modello. Infatti, il litio ritarda l'insorgenza dei sintomi motori e rallenta la loro pregressione. Inoltre, il trattamento con litio si è rivelato efficace nel contrastare tutte le alterazioni morfologiche osservate nel nostro modello, preservando il numero, la dimensione, la morfologia e la corretta localizzazione dei motoneuroni. Infine, il litio agisce anche sulla distribuzione della proteina SMN, la cui immunopositività nei topi SMA III appare simile a quella osservata nei topi WT.

Ulteriori indagini sono necessarie per stabilire i meccanismi che sottostanno agli effetti neuroprotettivi del litio in questo modello.

INTRODUZIONE

1. ATROFIA MUSCOLARE SPINALE

1.1 LA MALATTIA

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una patologia autosomica recessiva caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni del corno anteriore del midollo spinale, associata ad atrofia e paralisi muscolare progressive ad eziologia ancora sconosciuta e per la quale non esistono terapie efficaci (Monani, 2005). Infatti, questa malattia neurodegenerativa rappresenta una delle cause genetiche più frequenti di mortalità infantile, e tra le malattie autosomiche recessive ha una incidenza di 1 ogni 10.000 neonati, seconda solamente alla fibrosi cistica (Pearn, 1972; 1978; Roberts et al., 1970).

La SMA fu descritta per la prima volta nel 1891 da Guido Werdnig, un neurologo che lavorava in Austria, a Graz, il quale seguì il decorso della malattia su due fratelli, rispettivamente di 3 e 5 anni, fornendo una descrizione accurata dei sintomi e della loro progressione nei vari stadi di malattia; inoltre, sopraggiunta la morte, l'esame autoptico sul cadavere dei due piccoli pazienti gli permise di rilevare quelle alterazioni anatomico-patologiche che rappresentano ancora oggi una pietra miliare nello studio istologico della malattia (Werdnig, 1891; 1894; 1971). Qualche anno dopo, anche Johann Hoffmann, un professore tedesco di neurologia di Heidelberg, pubblicò un lavoro sull'atrofia muscolare progressiva nei bambini i cui sintomi erano identici a quelli descritti da Werdnig (Hoffmann, 1893; 1900). Negli anni '50 due medici svedesi, Eric Klas Henrik Kugelberg e Lisa Welander, identificarono un'altra forma della malattia, successivamente rinominata SMA III, caratterizzata da una insorgenza in età giovanile e una lenta progressione (Kugelberg and Welander, 1956).

In base all'età di insorgenza dei sintomi, al grado di compromissione del sistema muscolare e all'età del decesso, la SMA si può suddividere in tre tipi: (1) tipo I (grave); (2) tipo II (intermedia); (3) tipo III (leggero) (Munsat, 1991). Oltre a questi 3 tipi di SMA Dubowitz (1999) ha identificato anche una SMA di tipo 0 (molto grave), che però viene più frequentemente considerata un sottotipo della SMA di tipo I, mentre una SMA di tipo IV, con esordio in età adulta e una progressione della malattia molto lenta, è stata aggiunta negli ultimi anni, come unica forma tardiva di malattia (Russman, 2007; Wang et al., 2007). La Tabella 1 riporta la classificazione completa di tutte le forme di SMA ad oggi conosciute, la banca dati OMIM (Ereditarietà Mendeliana nell'Uomo, online).

	OMIM	Età d'esordio	Più elevata funzione raggiunta	Età di morte
Tipo I (grave, malattia di Werdnig-Hoffman)	253300	0-6 mesi	Impossibilità a sedersi	< 2 anni
Tipo II (intermedia)	253550	7-18 mesi	Possibilità a sedersi, impossibilità a stare in piedi	> 2 anni
Tipo III (leggera, malattia di Kugelberg-Welander)	253400	> 18 mesi	Possibilità a stare in piedi e a camminare	Adulto
Tipo IV (adulta)	271150	Dopo i 30 anni	Possibilità a camminare in età adulta	Adulto

OMIM= Online Mendelian Inheritance in Man (Ereditarietà Mendeliana nell'Uomo, online)

Tabella 1: Classificazione delle varie forme di SMA

(1) La SMA di tipo I (OMIM #253300), o malattia di Werdnig-Hoffmann, è la forma più grave, con esordio alla nascita o entro i primi 6 mesi di vita e morte entro i primi 2 anni di vita, e anche quella più comune, rappresentando circa il 50% di tutte le forme di SMA diagnosticate (Markowitz et al., 2004). Alcune forme di SMA I, caratterizzate da esordio prenatale e morte intrauterina o entro pochissimi giorni dalla nascita, sono state classificate da Dubowitz come SMA di tipo 0 (Dubowitz, 1999), sebbene tale distinzione non trova riscontro nella classificazione ufficiale riconosciuta da OMIM.

Il paziente presenta severa ipotonia, con interessamento maggiore dei distretti prossimali e del cingolo pelvico, paralisi flaccida simmetrica e nessun controllo dei movimenti della testa. Le braccia e le gambe risultano addotte, si osserva una riduzione dei movimenti spontanei e il bambino non riesce a mantenere la posizione seduta in assenza di supporto. La respirazione è generalmente diaframmatica, con ipotrofia dei muscoli respiratori accessori e torace a campana. Per effetto della denervazione bulbare si osservano fascicolazioni e debolezza dei muscoli della lingua, con problemi nell'inspirare e nel deglutire. Inoltre, la grave ipotonia dei muscoli inspiratori compromette la eliminazione delle secrezioni delle vie aeree, e aumenta il rischio di polmonite, che rappresenta una importante causa di morbosità e mortalità (Lunn and Wang, 2008).

(2) La SMA tipo II (OMIM #253550) è la forma intermedia. Esordisce generalmente tra il settimo e il diciottesimo mese di vita. I pazienti arrivano a mantenere il controllo del capo e la posizione seduta ma non riescono ad alzarsi o a sostenersi in piedi autonomamente né tantomeno a camminare. Si possono osservare tremori alle mani e fascicolazioni, specie a carico della lingua. Dopo il primo anno di vita l'evoluzione è molto lenta e il quadro clinico appare stazionario. La prognosi è

aggravata dalla cifoscoliosi, che necessita di intervento chirurgico od ortottico. Inoltre, come in pazienti con la malattia di tipo I, a causa della insufficiente funzione bulbare e della debolezza dei muscoli intercostali, diventano un problema l'eliminazione delle secrezioni tracheali e la tosse. A causa di questo, l'insufficienza respiratoria è una frequente causa di morte, che insorge soprattutto durante l'adolescenza (Lunn and Wang, 2008).

(3) La SMA tipo III (OMIM #253400), o malattia di Kugelberg-Welander, esordisce dopo i primi anni di vita e mostra una profonda eterogeneità di sintomi. Solitamente i primi sintomi sono rappresentati da ipostenia prossimale simmetrica che lentamente tende ad aggravarsi sebbene i pazienti riescano a eseguire i movimenti fondamentali come camminare. Una frequente complicanza riscontrabile in questi pazienti è rappresentata dallo sviluppo di scoliosi e affaticamento delle articolazioni. L'ipotonia e la debolezza muscolare generalmente progrediscono molto lentamente. Così, se alcuni pazienti, in adolescenza, necessitano di sedia a rotelle, altri riescono a camminare e a vivere una vita pressoché normale fino all'età adulta. In particolare, l'età di esordio della malattia appare critica per la velocità di progressione della malattia. Infatti, nella SMA di tipo IIIa, ad esordio prima dei 3 anni, solamente il 44% degli individui sono ancora capaci di camminare all'età di 20 anni, mentre nella SMA di tipo IIIb, nella quale la malattia esordisce dopo i 3 anni, il 90% degli individui conservano la capacità di camminare una volta raggiunti i 20 anni di età (Wirth et al., 2006; Lunn and Wang, 2008).

(4) La SMA di tipo IV (OMIM #271150), che esordisce in età adulta, dopo i trent'anni (Brahe et al., 1995; Clermont et al., 1995; Zerres et al., 1995), è caratterizzata da un inizio subdolo con debolezza muscolare a lenta progressione e compromissioni motorie lievi, senza problemi respiratori e nutrizionali. La

classificazione della SMA di tipo IV come forma lieve di malattia è giustificata dal fatto che i pazienti affetti da questa forma di SMA hanno una normale aspettativa di vita e rimangono in grado di camminare autonomamente (Wirth et al., 2006; Lunn and Wang, 2008).

Altre forme di SMA includono la SMA con problemi respiratori (SMARD), la SMA distale e la malattia conosciuta come atrofia muscolare spinale-bulbare (SBMA), chiamata anche malattia di Kennedy o, nel passato, SMA X-linked, dovuta a un difetto nel gene per il recettore degli androgeni, che mappa sul cromosoma X (Lunn and Wang, 2008). Si manifesta solo nei maschi mentre il 50% delle figlie femmine risultano portatrici sane (La Spada, 1999).

La morfo-patologia che caratterizza tutti i tipi di SMA, come descritto sin da Guido Werdnig alla fine del diciannovesimo secolo, è rappresentata da quattro caratteristiche (chiamate “tetrade neuropatologica”):

- 1) perdita di cellule a livello del corno anteriore (α -motoneuroni, γ -motoneuroni e interneuroni);
- 2) letti cellulari vuoti (a livello dei motoneuroni persi);
- 3) motoneuroni eterotopici causati dalla migrazione lungo la via d’uscita dal corno anteriore verso le radici ventrali del midollo spinale;
- 4) fascio di cellule gliali spinte dai motoneuroni eterotopici nelle radici spinali ventrali (Simic, 2008).

1.2 BASI GENETICHE DELLA SMA

Come è già anticipato, la SMA è una malattia conosciuta fin dalla fine del 1800, però solamente negli ultimi 20 anni sono state effettuate importanti scoperte riguardo le cause che portano alla malattia. Infatti, solamente nel 1990 diversi ricercatori attraverso analisi di linkage hanno identificato il locus del gene che provoca la SMA, così da classificare la SMA tra le malattie genetiche. In particolare lo studio effettuato da Brzustowicz et al. (1990) su 13 famiglie a cui era stata diagnosticata SMA di varia tipologia, portò alla scoperta che le diverse forme di SMA mappavano su un singolo locus, localizzato sul braccio lungo del cromosoma 5, nella regione 5q11.2-13.3. Nello stesso anno anche un gruppo di ricerca francese, attraverso uno studio su 24 famiglie etnicamente diverse, localizzò all'interno del braccio lungo del cromosoma 5 la mutazione che causava la SMA (Melki et al., 1990). L'iniziale range di 10 cM (centiMorgan), entro il quale ricadeva il gene, fu successivamente ridotto a una regione di 1-2 cM grazie alla mappatura ricombinante (Brzustowicz et al., 1992; Clermont et al., 1994; Wang et al., 1995). Attraverso la clonazione della regione del gene responsabile della malattia, sono state identificate multicopie di microsatelliti (per esempio, CMS1, C212, C272) e altre sequenze genomiche (Figura 1).

Questa regione instabile è soggetta a riarrangiamento intracromosomiale, tra cui duplicazioni, conversioni e delezioni geniche *de-novo* (Melki et al., 1994; Burghes, 1997; Schmutz et al., 2004). Malgrado la complessità genomica di questa regione, Melki e collaboratori (Melki et al., 1994) scoprirono un piccolo frammento di 11kb che ibridava univocamente con una ripetizione telomerica che mancava nei pazienti, restringendo così ulteriormente la regione candidata a contenere il gene della SMA. Ad un anno da questa scoperta, nel 1995, dopo aver sondato una libreria di cDNA encefalica fetale umana con il DNA genomico proveniente dalla regione candidata, il

gruppo francese diretto da Judith Melki identificò finalmente il gene responsabile della malattia, che venne chiamato *SMN* (*Survival Motor Neuron*) (Lefebvre et al., 1995).

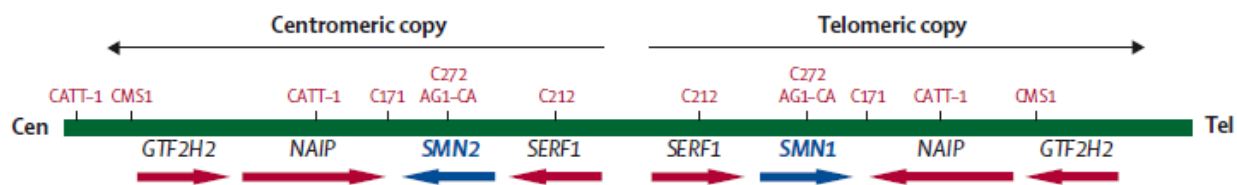


Figura 1 Mappa genica del locus della SMA (da Lunn and Wang, 2008).

Le copie del gene *SMN* sono contenute in due larghi frammenti genomici invertiti (linee nere orizzontali) all'interno di questa regione sul cromosoma 5q13. *SMN1* (blu) è localizzato in prossimità della regione telomerica (copia telomerica) mentre almeno una copia di *SMN2* (blu) è contenuta all'interno della regione centromerica (copia centromerica). Altri geni in prossimità delle copie di *SMN* sono mostrati in nero. Le frecce blu e rosse denotano la direzione della trascrizione rispettivamente di *SMN* e degli altri geni. Marcatori microsatelliti multicopia (rosso) sono inseriti all'interno di queste ripetizioni genomiche.

Nel genoma umano, il gene *SMN* è presente in molteplici copie: una di *SMN1* (*SMN^T*, telomerico) e varie di *SMN2* (*SMN^C*, centromerico). Entrambi i geni contengono nove esoni e otto introni in una regione genomica di circa 20 kb. Il gene *SMN1* codifica per la forma completa (full-length) della proteina SMN, di 38 kDa e 294 aminoacidi come sequenza primaria. La proteina SMN è altamente conservata dal lievito all'uomo e viene espressa in tutti i tessuti (Schrank et al., 1997; Miguel-Aliaga et al., 1999; Paushkin et al., 2000). La duplicazione del gene *SMN*, si ritrova unicamente nei primati mentre altre specie animali, tra cui i roditori hanno solamente una copia genica, indicata come *Smn*. Tuttavia, solo nell'Uomo la duplicazione di *SMN* ha portato alla comparsa del gene *SMN2*, poiché gli scimpanzé pur avendo copie multiple (da 2 a 7) di geni *SMN* non hanno il gene *SMN2* (Rochette et al., 2001).

Il gene *SMN2* differisce da *SMN1* solamente per cinque nucleotidi che si trovano tutti a livello del terminale 3'. Sebbene tutti questi nucleotidi siano contenuti all'interno di regioni non codificanti, e quindi teoricamente non abbiano ripercussioni sulla corretta sequenza aminoacidica della proteina risultante, tuttavia uno di questi nucleotidi responsabile della mutazione da C a T in posizione +6 della regione codificante per l'esone 7 (Ex7+6), è in grado di promuovere lo splicing alternativo dell'esone 7, producendo una isoforma tronca di proteina SMN nella quale l'esone 7 è assente (*SMN Δ 7*). Lo splicing dell'esone 7 si verifica in circa il 90% dei trascritti precoci (hn RNA) derivanti dal gene *SMN2*. La proteina *SMN Δ 7* risultante, carente di 16 residui aminoacidici, codificati dall'esone deletato, non è funzionale ed è altamente instabile, venendo rapidamente degradata (Lorson and Androphy, 2000; Chang et al., 2004; Vitte et al., 2007). Solo nel 10% dei casi il hn-RNA derivante da *SMN2* lo splicing avviene correttamente generando una proteina full-length (Lefebvre et al., 1995).

Si ritiene che la delezione o mutazione con perdita di funzione in omozigosi del gene *SMN1* sia responsabile di tale malattia, in quanto il 98% circa dei casi di SMA presentano delezioni, riarrangiamenti o mutazioni in omozigosi del gene stesso (Hahnen et al., 1995; Lefebvre et al., 1995). Almeno una copia del gene *SMN2* è presente e funzionale in tutti i pazienti, ma la proteina tronca da esso codificata non è evidentemente in grado di compensare il deficit del gene *SMN1*. Tuttavia, è stato suggerito che l'efficienza dello splicing di *SMN2* potrebbe variare considerevolmente nelle diverse forme di SMA, portando alla produzione di un trascritto full-length di *SMN2* fino al 50% (Gavrilov et al., 1998), determinando così la diversa gravità delle varie forme della malattia. Talvolta oltre all'esone 7 può mancare anche o solamente l'esone 5 (Lorson and Ahnen, 1999; Lorson and Androphy, 2000). La Tabella 2

riassume tutte le mutazioni missenso che sono state riscontrate nei pazienti di SMA di diversa gravità.

Mutazione	Posizione della mutazione		Tipo di SMA	Numero di copie di SMN2	Possibilità di recupero in modelli di SMA di topo o pesce	Abilità di legare SMN	Abilità di legare proteine Sm	Abilità di assemblare snRNP quando sono presenti basse quantità di SMN full-length
	Esone	Dominio						
A2G	1	ND	III	1	High	++	++	++
D30N	2a	Gemin2	II	2	ND	+++	+++	+++
D44V	2A	Gemin2	III	1	ND	+++	+++	++
W92S	3	Tudor	I	3	ND	ND	+	ND
V94G	3	Tudor	II	3	ND	ND	ND	ND
G95R	3	Tudor	III	1	ND	+++	+++	ND
A111G	3	Tudor	Ib	2	High	+++	+++	+++
I116F	3	Tudor	Ib	2	ND	ND	ND	+
Y130C	3	Tudor	III	2	ND	ND	ND	ND
E134K	3	Tudor	I	2	ND	+++	+	+
Q136E	3	Tudor	I	1	ND	ND	ND	+
A188S	4	ND	I	ND	ND	ND	ND	ND
P245L	6	oligomer	III	ND	ND	ND	ND	ND
L260S	6	oligomer	II	2	ND	ND	ND	ND
S262G	6	oligomer	III	1	ND	ND	ND	ND
S262I	6	oligomer	III	1	ND	++	++	ND
M263R	6	oligomer	I	2	ND	ND	ND	ND
M263T	6	oligomer	II	1	ND	ND	ND	ND
S266P	6	oligomer	II	2	ND	ND	ND	ND
Y272C	6	oligomer	II	2	No	+	+	+
H273R	6	oligomer	II	ND	ND	ND	ND	ND
T274I	6	oligomer	III	1	ND	++	++	+++
G275S	6	oligomer	III	ND	ND	ND	ND	ND
G279C	7	oligomer	I	ND	ND	ND	ND	ND
G279V	7	oligomer	I	ND	No	+	+	+

Tabella 2 Classificazione delle mutazioni di SMN che portano alla SMA

BOX 1 MECCANISMI MOLECOLARI CHE REGOLANO LO SPLICING DELL'ESONE 7 NEL GENE SMN

L'esone 7 comprende 54 bp, è caratterizzato da un debole sito di splicing 3' e presenta elementi addizionali ausiliari, necessari per lo splicing (Lim and Hertel, 2001). L'inclusione dell'esone 7 nell'RNA messaggero di *SMN* è regolata da un certo numero di elementi cis con azione positiva sullo splicing, chiamati sequenza enhancer dello splicing esonico (ESE) oppure sequenza enhancer dello splicing intronico (ISE), e elementi cis con azione negativa sullo splicing, chiamati sequenza silencer dello splicing esonico (ESS) o sequenza silencer dello splicing intronico (ISS). Questi elementi cis sono riconosciuti dalle proteine che mediano il processo di splicing: proteine ricche di domini serina-arginina (SR), proteine SR-simili e ribonucleoproteine nucleari eterogenee (hnRNP). Cartegni e Kranier (2002) hanno dimostrato che la mutazione del nucleotide da C a T in Ex7+6 all'interno di *SMN2* disturba il funzionamento di una ESE, che normalmente promuove lo splicing grazie al riconoscimento del fattore di splicing 2 (SF2), anche conosciuto come fattore di splicing alternativo (ASF). SF2/ASF interagisce con la classe U2 di piccole ribonucleoproteine (U2 snRNP) e il suo fattore ausiliario (U2AF) all'estremità dell'introne 6 per aiutare la rimozione di tale introne durante la trascrizione di *SMN1*. La ricostruzione di questo ESE riconosciuto da SF2/ASF, grazie al ripristino della timina in citosina in Ex7+6 del gene *SMN2*, ristabilisce il corretto splicing di *SMN2* con l'inclusione dell'esone 7 (Cartegni and Kranier, 2002). Kashima e Manley (2003) contestarono l'ipotesi dell'ESE sostenendo che la transizione da C a T nell'esone 7 creasse un ESS in *SMN2*, che avrebbe favorito l'esclusione dell'esone 7

legando un'altra molecola, l'hnRNP A1. Kashima et al. (2007a) hanno mostrato che la mutazione C>T in *SMN2* aumenta il legame con hnRNP A1. Il reclutamento di hnRNP A1 potrebbe impedire stericamente la formazione e/o la stabilità del complesso snRNP necessario per il corretto splicing. Il distacco di questo hnRNP A1 dipendente da ESS con tecniche di mutazione o interferenza di RNA (RNAi) riporta il corretto splicing di *SMN2* ma non ha effetti su *SMN1* (Kashima and Manley et al., 2002). Una transizione A>G nell'introne 7 (In7+100) in *SMN2* potrebbe creare un secondo sito legante hnRNP A1 per favorire ulteriormente l'esclusione dell'esone 7 (Kashima et al., 2007b). In un tentativo per combinare entrambe le teorie, Cartegni et al., (2006) hanno mostrato che hnRNP A1 potrebbe contrastare l'effetto di SF2/ASF su ESE per promuovere l'esclusione dell'esone 7, specialmente in *SMN2*, dove questo ESE è inattivo. Tuttavia, l'esatto meccanismo che sta alla base dell'inclusione o esclusione dell'esone 7 durante lo splicing del pre-mRNA rimane in discussione (Figura box 1 da Wirth et al 2006).

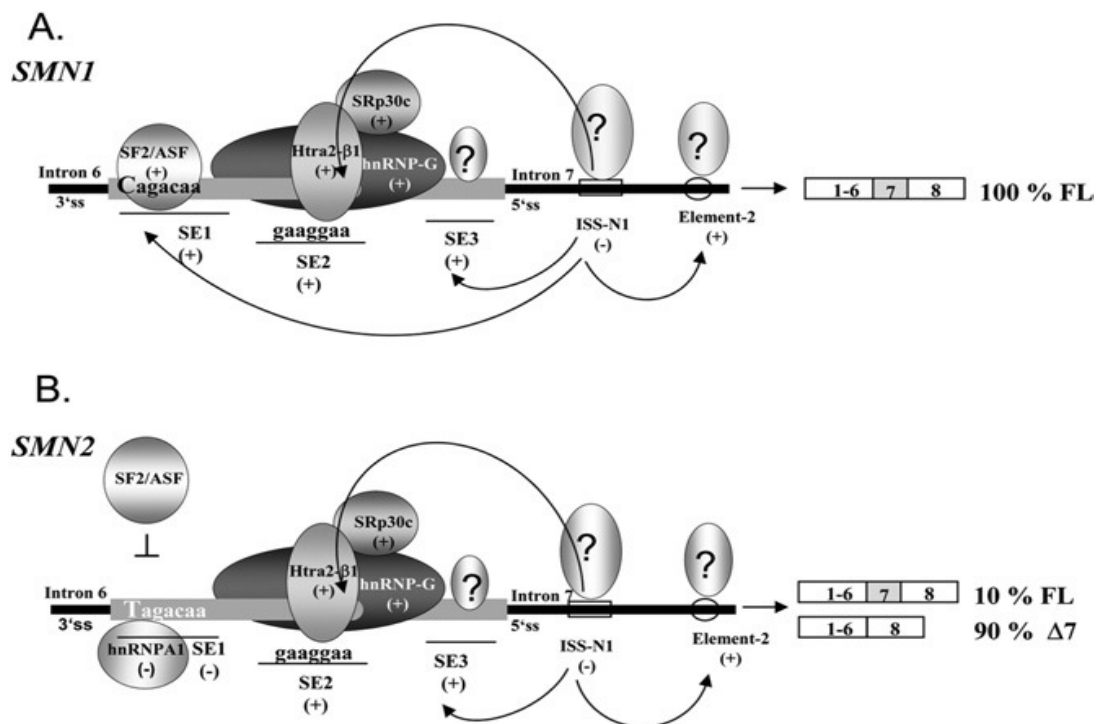


Figura Box 1 La regolazione dello splicing dell'esone 7 nei geni *SMN1* e *SMN2*.

L'esone 7 di *SMN1* contiene una sequenza eptamerica (SE1) al terminale 5' che è riconosciuta dalla proteina SR SF2/ASF. In *SMN2*, la transizione da C a T disturba il riconoscimento di questa sequenza eptamerica all'interno di SE1 da parte del fattore di splicing SF2/ASF in due modi: 1) attraverso la modificazione della sequenza di legame che non viene più riconosciuta da SF2/ASF (Cartegni and Krainer, 2002; Cartegni et al., 2006); 2) attraverso la promozione del legame di un altro fattore, hnRNP A1, alla stessa sequenza (Kashima and Manley, 2003; Cartegni et al., 2006). Entrambi i meccanismi provocano l'esclusione dell'esone 7 dall'mRNA maturo. Sia *SMN1* che *SMN2* contengono un ESE nella parte centrale dell'esone 7 (SE2) che è riconosciuto da Htra2-β1 e i suoi partner hnRNP-G and SRp30c (Hofmann et al., 2000; Hofmann and Wirth, 2002; Young et al., 2002).

Complessivamente, questi elementi facilitano l'inclusione dell'esone 7 in entrambi gli mRNA degli *SMN*. In sintesi, i trascritti full-length di *SMN1* sono prodotti solamente quando i domini SE2 sono intatti (Lorson and Androphy, 2000). L'overespressione dei fattori di splicing SE2-dipendenti ripristina il trascritto full-length di *SMN1* in circa l'80% dei casi (Hofmann et al., 2000; Hofmann and Wirth, 2002). Al terminale 3' dell'esone 7 è stato identificato un altro enhancer di splicing esonico (SE3) (Lorson and Androphy, 2000). Inoltre, l'introne 7 contiene un ISS (ISS-N1) che esercita la sua funzione inibitoria sullo splicing (freccie ricurve) (Singh et al., 2006). I fattori di splicing *trans*-attivi che legano gli elementi di splicing intronico o SE3 non sono stati ancora identificati (Wirth et al., 2006).

In conclusione, in un individuo sano il gene *SMN1* produce sempre una proteina SMN full-length, mentre il gene *SMN2* trascrive per una proteina SMN full-length solamente nel 10% dei casi (nel restante 90% dei casi trascrive per una proteina tronca priva dell'esone 7, *SMN Δ 7*). Come schematizzato nella Figura 3, le diverse forme di SMA sono strettamente correlate ai livelli di proteina SMN full-length di volta in volta espressi: quando una mutazione che colpisce il gene *SMN1* porta alla sua delezione, o alla sua conversione in una forma che, come per il gene *SMN2*, è accompagnata da una riduzione significativa nell'espressione della proteina SMN full-length (Campbell et al., 1997; Feldkotter et al., 2002) la quantità di proteina funzionale è molto bassa e il fenotipo clinico molto grave (SMA di tipo I). Mutazioni del gene *SMN1* che comportano l'espressione di livelli man mano più elevati di proteina SMN full-length causano fenotipi clinici di malattia corrispondentemente più lievi, fino alla SMA III.

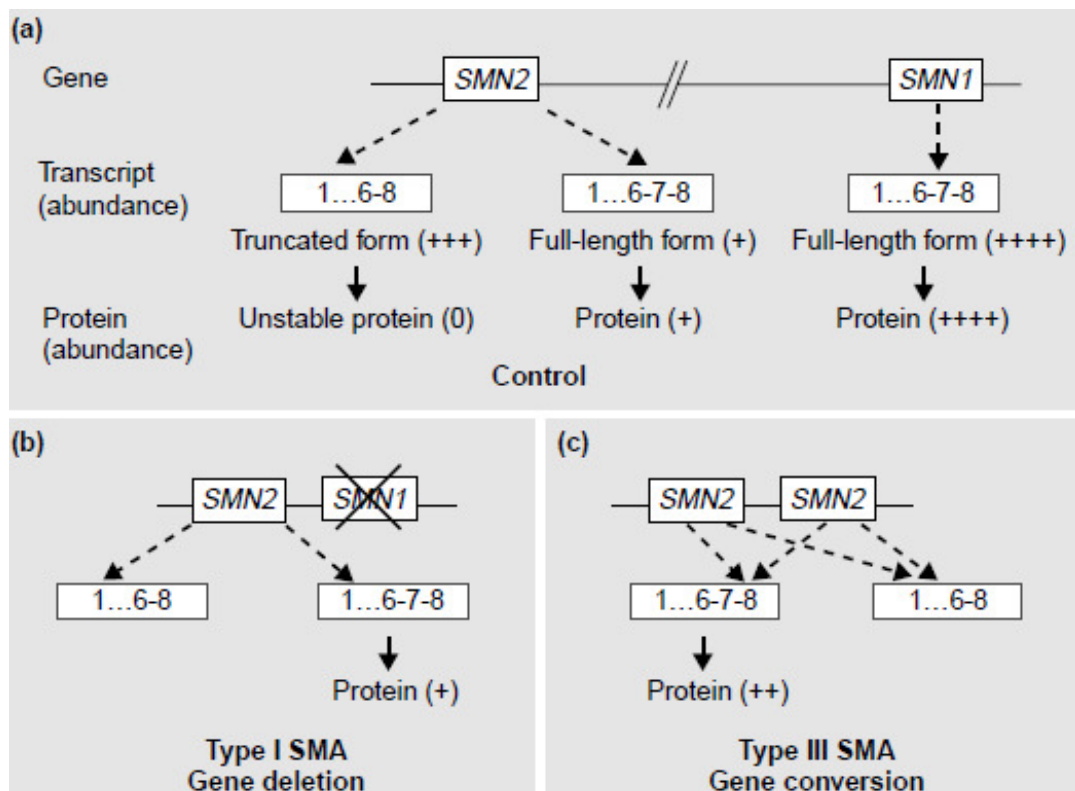


Figura 2 Le basi genetiche della SMA (da Frugier et al., 2002): schema semplificato.

1.3 LA PROTEINA SMN

Il gene *SMN1* codifica per la proteina SMN, di 38 kDa, contenente 294 aminoacidi, espressa sia nel citoplasma che nel nucleo di tutte le cellule, particolarmente negli alfa-motoneuroni. Recentemente è stata scoperta una isoforma tronca della proteina SMN negli assoni comprendente solamente gli esoni 1-3 e parte dell'introne 3 del terminale aminico (Setola et al., 2007). Dal momento che le mutazioni del gene *SMN1* trovate nei pazienti SMA mappano in diversi esoni, la forma assonica della proteina SMN non dovrebbe giocare un ruolo chiave nella SMA di quei pazienti che presentano mutazioni missenso in esoni che non sono compresi nella sequenza codificante di questa isoforma (Burghes, 2008).

All'interno dei nuclei, la proteina SMN si localizza in piccole strutture puntiformi (diametro di 0,1-0,2 μm), chiamate *gems*. I *gems*, identificati per la prima volta nella linea cellulare HeLa, sono strutture nucleari che contengono alte concentrazioni locali di SMN (Liu and Dreyfuss, 1996). I *gems* sono spesso associati con i *Cajal bodies* che sono implicati nella formazione e nella maturazione delle ribonucleoproteine (RNP). Studi successivi hanno mostrato che i *gems* colocalizzano con i *Cajal bodies* nei nuclei della maggior parte delle linee cellulari, ma sono separati dai *Cajal bodies* nei tessuti fetali (Carvalho et al., 1999; Young et al., 2001). La metilazione della coilina, la proteina marker dei *Cajal bodies*, regola l'interazione dei *Cajal bodies* con SMN e i *gems* (Hebert et al., 2002). La presenza di SMN nei *Cajal bodies* suggerisce un ruolo di SMN nella processazione dell'RNA nucleare.

In particolare, SMN è strettamente associato con diverse proteine considerate componenti essenziali di un complesso macromolecolare denominato "complesso SMN" (Figura 4). Queste proteine si chiamano Gemin poiché, come SMN, localizzano nei *gems* (Carissimi et al., 2006a). SMN interagisce con Gemin2,

Gemin3, Gemin5 e Gemin7, mentre Gemin4 e Gemin6 sono legate con il complesso SMN attraverso la loro interazione rispettivamente con Gemin3 e Gemin7. Gemin8 si lega con l'eterodimero Gemin6-Gemin7 così come con SMN e media l'associazione di Gemin6, Gemin7 e un altro componente, conosciuto come unrip, con il complesso SMN (Carissimi et al., 2006a,b). Unrip è un componente atipico del complesso SMN che si lega a Gemin6 e Gemin7 ma che non si localizza nei *gems* e nei *Cajal bodies* (Carissimi et al., 2005; Grimmler et al., 2005a). Altre interazioni tra le Gemin potrebbero ulteriormente contribuire all'organizzazione strutturale del complesso SMN (Otter et al., 2007). Date le limitate dimensioni della proteina SMN, è improbabile ritenere che tutte le interazioni con le Gemin avvengano sulla stessa molecola di SMN. Al contrario, l'oligomerizzazione di SMN, che permette la formazione di complessi di ordine superiore che vanno dai 20S agli 80S (e che è compromessa nei mutanti SMN dei pazienti SMA) (Lorson et al., 1998; Pellizzoni et al., 1999; Carissimi et al., 2005; 2006a), probabilmente ha un ruolo centrale nell'architettura del complesso SMN. È interessante notare che alcune componenti del complesso SMN sono state ritrovate anche all'esterno di tale complesso (Mourelatos et al., 2002; Carissimi et al., 2005, 2006b; Grimmler et al., 2005a), suggerendo per queste proteine altre funzioni cellulari oltre agli specifici compiti rivestiti all'interno del complesso SMN (Pellizzoni et al., 2007).

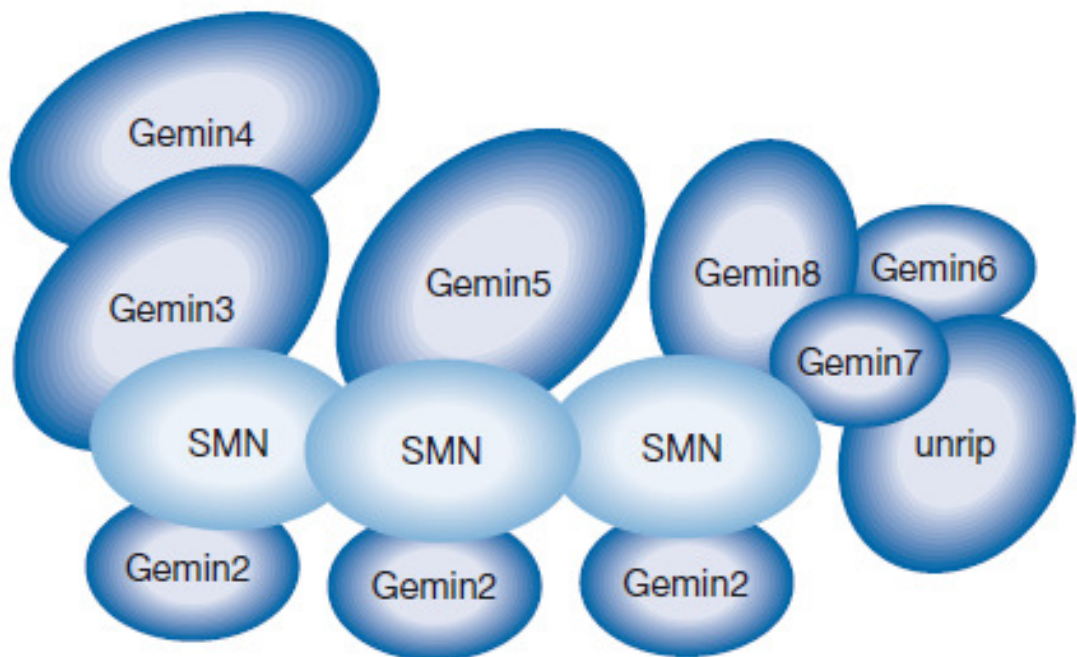


Figura 3 Struttura del complesso SMN (da Pellizzoni et al, 2007).

La proteina SMN lega Gemin2, Gemin3, Gemin5, Gemin7 e Gemin8, mentre Gemin4 e Gemin6 si associano ad SMN attraverso l'interazione rispettivamente di Gemin3 e Gemin7. Gemin8 lega anche l'eterodimero Gemin6-Gemin7, e media l'associazione di Gemin6, Gemin7 e unrip con SMN. La proteina SMN oligomerizza e, per semplicità, è rappresentata come un trimero sebbene possa formare strutture oligomeriche molto maggiori (Pellizzoni et al., 1999). La rappresentazione del complesso SMN è una semplificazione arbitraria poiché la stechiometria dei suoi componenti è sconosciuta.

Il complesso SMN è anche un classico componente di altri complessi multimolecolari rappresentati dagli spliceosomi nucleari (snRNP) (Will and Luhrmann, 2001; Meister et al., 2002; Paushkin et al., 2002) (Figura 5). Sebbene l'snRNP effettui lo splicing dell'hn-RNA nel nucleo, negli eucarioti superiori la biogenesi di snRNP inizia nel citoplasma e si completa nel nucleo. Nel citoplasma, il complesso SMN media la formazione di un anello eptamerico di proteine Sm disposto intorno ad una sequenza conservata di snRNA chiamata core di Sm (Meister et al., 2001; Meister and Fischer, 2002; Pellizzoni et al, 2002). La formazione di questo core di Sm avviene attraverso una via multistep, che prevede prima l'associazione delle proteine Sm con la proteina regolatrice della conduttanza al cloro (pICln) e con il complesso arginina metiltransferasi 5 (PRMT5) e successivamente il loro legame al complesso SMN, favorito dalla dimetilazione simmetrica di un sottogruppo di proteine Sm da parte del complesso PRMT5 che, aumentando la loro affinità nei confronti di SMN, si ritiene critico per la formazione di snRNP (Meister et al., 2002; Paushkin et al., 2002). Oltre alla formazione della parte centrale di Sm, il complesso SMN partecipa alla biogenesi degli snRNP anche attraverso altre attività. Infatti SMN interagisce con la trimetilguanossina sintasi 1 (TGS1), che potrebbe contribuire nell'ipermetilazione del terminale 5' delle snRNP successivamente alla formazione della parte centrale di Sm (Mouaikel et al., 2003).

Il complesso multimolecolare così formato, viene importato nel nucleo grazie al legame tra il complesso SMN, la snurportina e l'importina- β (Narayanan et al., 2004), dove va a costituire il cosiddetto *Cajal body*. A questo punto, altre modificazioni consentono la maturazione dell'snRNP che diviene in grado di svolgere la sua funzione biologica.

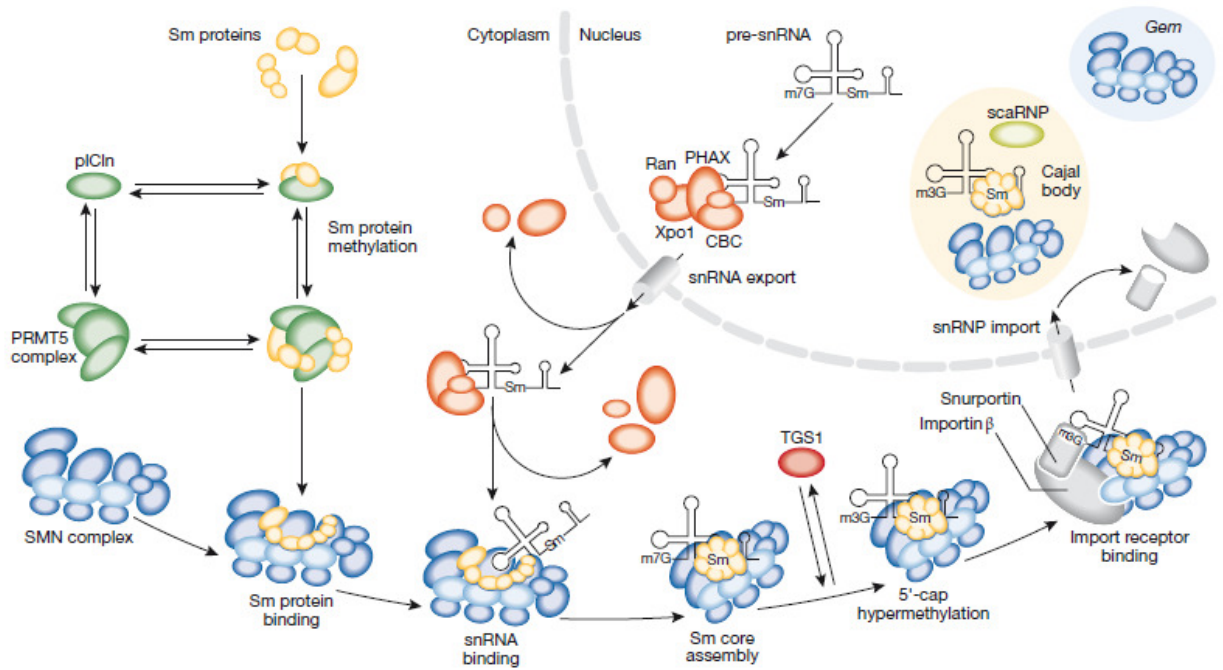


Figura 4 La via di biogenesi di snRNPs (da Pellizzoni, 2007).

L'RNA polimerasi II trascrive snRNA come precursore contenente un corto terminale 3'm7G nel nucleo. Il complesso legante il terminale (CBC) lega il nascente snRNA e media il reclutamento di adattatori fosforilati per l'esportazione dell'RNA (PHAX), esportina 1 (Xpo1) e proteina nucleare GTP ras-correlata (RanGTP) per l'esportazione nucleare. Nel citoplasma, le sette proteine Sm legano dapprima la proteina regolatrice la conduzione del cloruro (pICln) e la proteina arginina metiltransferasi 5 (PRMT5), la quale dimetila simmetricamente alcune proteine Sm come SMB, Smd1 e Smd3, e successivamente il complesso SMN. Il complesso SMN legato alle proteine Sm interagisce con snRNA e media la formazione del core di Sm. L'ipermetilazione del terminale 5' del snRNA da parte della trimetilguanosina sintasi 1 (TGS1) avviene dopo la formazione del core di Sm; sia il complesso SMN che la snurportina, la quale si associa con il terminale 5' di snRNA, successivamente si legano all'importina- β e mediano l'internalizzazione nucleare di snRNP. Si viene così a formare un complesso multimolecolare (*Cajal bodies*) nel quale snRNP subisce ulteriori step di maturazione tra cui la metilazione e la pseudouridilazione da parte di piccole ribonucleoproteine *Cajal body*-specifiche (scaRNP).

Altre proteine capaci di legarsi con SMN o con il complesso SMN (Claus et al., 2004; Eggert et al., 2006; Cheng et al., 2007; Simic, 2008) sono coinvolte nella formazione degli spliceosomi. Tra queste citiamo le proteine FMRP (Piazzon et al., 2008), hnRNPQ/R (Mourelatos et al., 2001; Rossoll et al., 2002) e la profilina (Sharma et al., 2005), che legandosi a SMN potrebbero influenzare la funzione di SMN come assemblatore di snRNP.

SMN è stato anche suggerito essere importante per la formazione di complessi snoRNP (Pellizzoni et al., 2001; Jones et al., 2001), piccoli complessi nucleari di proteine e snoRNA il quale agisce come una guida per la modificazione (metilazione o pseudouridilazione) di RNA ribosomiale, RNA transfer e snRNA da parte delle componenti proteiche del complesso (Matera et al 2007).

1.4 MECCANISMI PATOGENETICI DELLA SMA

Sono state avanzate due ipotesi per spiegare il meccanismo che porta alla degenerazione degli alfa-motoneuroni nella SMA (Burghes and Beattie, 2009). La prima suggerisce che la difettosa formazione di snRNP possa determinare uno splicing non adeguato di un selettivo gruppo di geni che sono importanti per l'instaurarsi delle corrette connessioni dei motoneuroni (Eggert et al., 2006; Pellizzoni, 2007; Gabanella et al., 2007). La seconda suggerisce che SMN abbia una funzione importante a livello degli assoni dei motoneuroni che verrebbe a mancare nella SMA (Fan and Simard, 2002; McWhorter et al., 2003; Rossoll et al., 2003; Carrel et al., 2006; Eggert et al., 2006; Gabanella et al., 2007; Pellizzoni, 2007).

In accordo con la prima ipotesi, la riduzione di SMN causa una alterazione nella formazione di snRNP, la quale altera a sua volta la quantità o la forma di snRNP, causando così una alterazione nello splicing di specifici trascritti genici. Per valutare se queste alterazioni possano portare alla SMA, vari studi si sono prefissati di misurare il ruolo effettivo di SMN nell'assemblare le proteine Sm sull'snRNA sia in cellule derivate da pazienti SMA che da tessuti provenienti da topi SMA (Meister et al., 2000; Pellizzoni et al., 2002; Gabanella et al., 2005, 2007; Grimmler et al., 2005b; Shpargel and Matera, 2005; Wan et al., 2005; Zhang et al., 2008). Questi studi hanno dimostrato che la formazione di snRNP nella SMA è ridotta significativamente ed è correlata con il fenotipo grave. Tuttavia rimangono ancora sconosciuti quale siano i target genetici alterati e resta da spiegare quale difetto sia alla base delle forme più lievi di malattia.

Come è stato già detto, una isoforma di SMN è stata ritrovata negli assoni. In particolare, SMN è stata ritrovata nei coni d'emergenza all'interno di un complesso che non contiene proteine Sm e che quindi ha un significato diverso rispetto al

complesso SMN descritto precedentemente (Fan and Simard, 2002; Rossoll et al., 2002; Zhang et al., 2003; 2006; Sharma et al., 2005).

In accordo con la seconda ipotesi, il knockdown di SMN in zebrafish porta a specifici difetti negli assoni dei motoneuroni, tra cui assoni tronchi e/o ramificati (McWhorter et al., 2003). Colture di motoneuroni provenienti da topi SMA mostrano un fenotipo simile, con una riduzione di SMN, corti assoni con piccoli coni d'emergenza e ridotti livelli di mRNA per la β -actina (Rossoll et al., 2003), che determinerebbero una alterata distribuzione di canali $Ca_v2.2$ e conseguenti alterazioni elettrofisiologiche (Jablonka et al., 2007). In supporto a questo ruolo della β -actina nella SMA, è stato recentemente scoperto che la plastina 3, una proteina che stabilizza il filamento di actina (Bretscher, 1981; Glenney et al., 1981), risulta essere un modulatore della SMA, in quanto l'overespressione di plastina 3 è risultata in grado di contrastare le alterazioni degli assoni in colture di motoneuroni caratterizzati da una bassa espressione di SMN (Oprea et al., 2008). In effetti SMN e plastina 3 formano un complesso (Oprea et al., 2008), tuttavia non è chiaro se SMN sia effettivamente associato con i filamenti di actina. È possibile che queste due ipotesi non siano mutuamente esclusive ma siano invece collegate l'una all'altra. Infatti, non è da escludere che la ridotta formazione di snRNP possa influenzare lo splicing di geni importanti per il corretto sviluppo degli assoni, tra cui quello per la plastina 3.

2. MODELLI ANIMALI DI SMA

Come abbiamo visto, il gene *SMN* è altamente conservato nell'evoluzione dove è generalmente presente in unica copia. Nei primati si assiste per la prima volta alla duplicazione del gene *SMN*, ma solo nell'Uomo tale duplicazione ha portato alla comparsa di due geni distinti *SMN1* e *SMN2*. Il gene *SMN2*, che differisce da *SMN1* di soli cinque nucleotidi localizzati in regioni silenti del gene, produce tuttavia un trascritto che per il 90% si presenta privo di un esone, portando così alla sintesi di una proteina SMN tronca, instabile e non funzionale. In tutti i casi di SMA il gene *SMN1* è apparso mancante o non in grado di codificare per una forma funzionale di proteina SMN. Il grado di compensazione messa in opera dal gene *SMN2* risulta invece determinante nel produrre i diversi fenotipi clinici.

Pertanto, gli studi sperimentali sulla SMA hanno cercato negli anni di costruire modelli animali di malattia, allo scopo di acquisire conoscenze fondamentali sulle vie molecolari e cellulari coinvolte, decifrare il(i) meccanismo(i) eziopatogenetici responsabili della malattia e fornire una base scientifica per l'esecuzione di adeguati esami diagnostici. In tutti i modelli animali impiegati (lieviti, nematodi, mosche, zebrafish e topi), il punto di partenza è stato la soppressione del gene *SMN* e (dal momento che la delezione in omozigosi del'unico gene *SMN* presente in queste specie porta a morte intrauterina) l'inserimento di forme modificate del gene umano *SMN2*. Nei successivi paragrafi verrà offerta una rassegna dei diversi modelli, dei quali verranno indicati i punti di forza e i limiti (Schmid and DiDonato, 2007).

2.1 I LIEVITI COME MODELLO EUCARIOTICO UNICELLULARE DI SMA

I modelli di lievito sono considerati il primo modello per lo studio genetico di cellule eucariotiche. Le due specie più comunemente utilizzate sono *Schizosaccharomyces pombe* and *Saccharomyces cerevisiae*. Sebbene la semplicità di un organismo unicellulare lo renda ideale per lo screening, diventa meno rilevante quando nella patologia sono coinvolti sistemi complessi come organi e proteine pleiotropiche.

S. pombe possiede un ortologo del gene umano *SMN*, conosciuto come proteina Yab8, o ySMN, che sembra non avere corrispondenti in *S. cerevisiae*. Come in tutti i modelli animali studiati, la proteina di lievito ySMN è essenziale per la vitalità cellulare. Tuttavia, diversamente dagli altri modelli, la mancanza o la perdita di funzione di ySMN in *S. pombe* non può essere prevenuta dalla introduzione esogena di *SMN* umana. La perdita di ySMN è letale, mentre la sua over-espressione, sebbene non letale, è deleteria in quanto provoca un ritardo della crescita (Paushkin et al., 2000). Queste osservazioni suggeriscono che, negli eucarioti, la funzione di *SMN* è fortemente conservata.

2.2 MODELLI DI SMA NEGLI INVERTEBRATI: NEMATODI (CAENORHABDITIS ELEGANS)

Essendo organismi estremamente semplici, i Nematodi offrono il vantaggio di poter studiare fenomeni biologici su scala cellulare all'interno di un sistema multicellulare complesso (Sulton et al., 1983). In *Caenorhabditis elegans*, che presenta meno di 100 motoneuroni, è stato identificato un ortologo di *SMN* (*CeSMN*) (Talbot et al., 1997). Studi di espressione hanno mostrato che *CeSMN* è trascritto in tutto lo sviluppo, in particolare a livello dei nuclei delle cellule del sistema nervoso (Miguel-Aliaga et al., 1999). Studi di perdita di funzione suggeriscono che *CeSMN* è un gene

essenziale che è necessario per la vitalità embrionale poiché il knockdown germinale di SMN, usando RNA inibitorio (RNAi), ha come risultato una significativa diminuzione della progenie (Miguel-Aliaga et al., 1999; Culetto and Sattelle, 2000). La maggior parte delle proteine con cui CeSMN si lega (Burt et al., 2006) hanno funzioni coerenti con il ruolo di SMN nella formazione dello spliceosoma, nell'interazione con proteine nucleari, nel trasporto nucleo-citoplasmatico di RNA e indirettamente nel riparo assonale durante la rigenerazione (Galtrey et al 2007). L'overespressione di CeSMN produce effetti più deleteri rispetto a quelli osservati in *S. pombe*, provocando sterilità ed elevata letalità embrionale.

2.3 *MODELLI DI SMA NEGLI INVERTEBRATI: ARTROPODI (DROSOPHILA MELANOGASTER)*

Il database genomico di *Drosophila melanogaster* rivela, per SMN, un singolo ortologo in posizione 73A9. Questo genera un trascritto con un singolo esone di 828 bp, e una proteina di 226 aa che ha una forte trascrizione materna nelle primissime fasi dello sviluppo, la quale non è più riscontrabile già al 50% dello sviluppo embrionale (Chan et al 2003). L'espressione della proteina, invece, risulta essere alta sia a livello embrionale che nella pupa e nell'adulto (Rajendra et al., 2007). Studi di espressione suggeriscono che SMN viene espressa sia nel tessuto nervoso che in quello muscolare (Miguel-Aliaga et al., 2000; Chan et al., 2003; Rajendra et al 2007). La perdita di funzione è stata riscontrata in 2 linee di mutanti, la prima con una mutazione puntiforme nel motivo di dimerizzazione (l(3)Ao73), la seconda, con una mutazione puntiforme nello stesso motivo (conosciuto come SMN^B), e consiste in alterazioni motorie ad avanzati stadi di sviluppo e letalità allo stadio larvale tardivo. Il principale fenotipo a livello del motoneurone è stato descritto come un

mismatching tra la membrana pre-sinaptica e quella post-sinaptica, in cui i motoneuroni non riescono a prendere i corretti contatti sulle cellule muscolari dove, tra l'altro, i recettori del glutammato appaiono delocalizzati (Chan et al., 2003). Utilizzando driver neuronali, mesodermici o simultanei è stata saggiata la capacità di trascritti full-length di recuperare le alterazioni motorie dovute alla mancanza di proteina SMN funzionale ed è stato osservato un recupero a tutti gli stadi di sviluppo quando entrambi i driver sono presenti, mentre i driver mesodermici da soli risultano più efficaci dei driver neuronali nel ripristinare le alterazioni motorie da mancanza di SMN. In linea con i risultati riportati, le alterazioni muscolari sono preminenti rispetto ai difetti neuronali (Rajendra et al., 2007). Data l'evidenza di una diretta interazione tra SMN e α -actinina e di una compromissione della localizzazione di α -actinina nei muscoli toracici di deboli mutanti di SMN (Rajendra et al., 2007), è stato ipotizzato che le principali alterazioni nel fenotipo mutante di SMN possano derivare da una interrotta interazione SMN-actinina. L'overespressione di SMN umano in *Drosophila*, non produce alterazioni deleterie associate con un'espressione ectopica dell'ortologo di *Drosophila*.

2.3 MODELLI DI SMA NEI VERTEBRATI: PESCI (ZEBRAFISH)

Poiché non sono attualmente conosciute mutazioni del gene *SMN* indotte naturalmente o chimicamente in zebrafish, la procedura più comune per effettuare studi di perdita di funzione consiste nell'effettuare knockdown di morpholino, il quale sopprime transitoriamente i livelli della proteina (McWhorter et al., 2003). Un morpholino è un oligonucleotide antisense modificato che può essere prontamente iniettato all'interno di embrioni di zebrafish allo stadio di 1 o 2 cellule; in particolare, se progettato per legarsi a un sito di inizio della trascrizione di un particolare gene,

interferisce con l'apparato di trascrizione della cellula, così da portare ad un knock-down dei livelli endogeni della proteina corrispondente. In alternativa, può essere progettato per indurre un'alterazione della sequenza di riconoscimento per fattori di splicing all'interno del gene di una determinata proteina, in modo da causare uno splicing aberrante che porta a una proteina non funzionale (Nasevicius and Ekker, 2000). Con questo approccio si ottiene una diminuzione dei livelli di *Smn* del 75% durante lo sviluppo precoce, condizione che risulta simile a quella dei pazienti SMA (McWhorter et al., 2003). Il risultato è una morte del 55% degli embrioni nelle 24h dopo la fecondazione; gli embrioni che sopravvivono non mostrano differenze nel numero dei motoneuroni a 24h ma si notano assoni corti e/o eccessivamente ramificati. Questi risultati coincidono con quelli ottenuti in colture di motoneuroni di topi SMA (Rossoll et al., 2003; Jablonka et al., 2004). Inoltre, il knockdown di *Smn* nei motoneuroni non ha effetto sullo sviluppo muscolare ma determina uno switch fenotipico degli assoni dei motoneuroni che risultano simili a quelli dei neuroni efferenti viscerali. Tuttavia, anche se anomali in questo modello gli assoni motori sono ancora in grado di innervare i muscoli durante i primi stadi di sviluppo, così come accade nei pazienti SMA presintomatici, nei quali il numero di unità motorie appare inalterato (Bromberg and Swoboda, 2002).

In contrasto con quanto osservato in *D melanogaster* nella quale i mutanti SMN avevano bisogno dell'espressione di SMN sia nelle cellule muscolari che in quelle nervose per recuperare completamente il fenotipo normale, in questo modello l'espressione di SMN nel motoneurone sembra fondamentale per un corretto sviluppo delle connessioni del motoneurone con la periferia motoria.

Nel loro insieme, questi risultati suggeriscono che un problema di mantenimento sinaptico, determinato da un difetto primario nella morfogenesi degli assoni dei

motoneuroni o un difetto secondario provocato da bassi livelli di SMN nel motoneurone, possa risultare nella generazione di motoneuroni anomali.

2.4 MODELLI DI SMA NEI VERTEBRATI: RODITORI (TOPO)

I topi hanno un singolo gene *Smn* che è simile al gene umano *SMN1*: esso contiene un nucleotide C alla posizione +6 dell'esone 7, ed è localizzato sul cromosoma 13 nella regione sintenica a quella del cromosoma umano (5q13) (DiDonato et al., 1997). Questa informazione è stata sfruttata in differenti approcci strategici volti a modificare il genoma murino per creare modelli di SMA utili nello studio patogenetico della SMA. La prima strategia ha utilizzato la tecnica della ricombinazione omologa per indurre una fusione in-frame tra l'esone 2° di *Smn* e il gene *lacZ* di *Escherichia coli* e generare in tal modo un allele knockout per il gene *Smn* (Schrack et al., 1997). In questo modello, alla soppressione dell'espressione di *Smn* nell'allele selezionato si aggiunge il fatto che il gene batterico *lacZ* risulta posto sotto il controllo trascrizionale e traduzionale di *Smn*. Questa particolare caratteristica è vantaggiosa poiché permette che l'espressione di *Smn* sia facilmente determinata a livello cellulare mediante la colorazione con X-gal per rilevare l'attività della β -galattosidasi codificata da *lacZ*. Invece, incroci che producono embrioni mutanti omozigoti mancanti del gene funzionale *Smn* (*Smn*^{-/-}) muoiono prima dell'impianto nella parete uterina (Shrank et al., 1997). Gli effetti deleteri iniziano durante lo stadio di morula e coincidono con la deplezione di trascritti materni nell'ocita e il conseguente inizio della trascrizione dei geni embrionali. Questi risultati sono coerenti con quelli conseguiti in altri modelli animali (vedi paragrafi riguardanti *C. elegans* e *D. melanogaster*) in cui all'interno degli oociti si riscontrano alti livelli di trascritti di *Smn* (Miguel-Aliaga et al., 1999; Chan et al.,

2003). Essi inoltre confermano che la proteina SMN durante lo sviluppo è necessaria per tutti i tipi cellulari (non solo per i motoneuroni), considerato il suo ruolo essenziale nella biogenesi di snRNP e quindi nello splicing di hnRNA. Per valutare la capacità di produrre copie funzionali da parte di *SMN2* nei pazienti SMA, due distinti gruppi di ricerca hanno generato topi transgenici che, oltre alla mutazione omozigote del gene murino *Smn*, contenevano all'interno il locus umano *SMN2* (Hsieh-Li et al., 2000; Monani et al., 2000). Il transgene *SMN2* creato dai laboratori di Burghes, *SMN2(89Ahmb)*, conteneva solamente il locus genico *SMN2*, mentre il transgene creato dai laboratori di Li, *SMN2(2Hung)*, conteneva *SMN2*, il gene *SERF1* e una porzione del gene della proteina inibitrice dell'apoptosi neuronale (*NAIP*).

Sebbene ci siano differenze tra questi due modelli transgenici, le osservazioni fondamentali fornite dai due gruppi sono praticamente le stesse:

- *SMN2* è capace di compensare la letalità embrionale dei topi *Smn*^{-/-},
- un aumento del numero delle copie di *SMN2* si correla con un fenotipo più lieve della malattia e conferma gli studi familiari che mostrano la variazione della severità della malattia che è dipendente dal numero delle copie di *SMN2* (Coover et al., 1997; Lefebvre et al., 1997; McAndrew et al 1997) e
- il fenotipo SMA può essere completamente recuperato dall'espressione della proteina SMN prodotta da un numero sufficiente di copie di *SMN2*.

Nell'insieme, questi risultati indicano *SMN2* come un fondamentale target terapeutico per il trattamento della SMA. I modelli creati da Burghes e da Li riproducono strettamente la forma grave di malattia che si osserva nei bambini (SMA D). Infatti i topi (*SMN2;Smn*^{-/-}) che posseggono 1-2 copie di *SMN2* producono bassi livelli di proteina e, di conseguenza, vengono a mancare i *gems*. Questi topi mostrano

un breve periodo presintomatico alla nascita, durante il quale sono fenotipicamente indistinguibili dai corrispondenti littermate, tuttavia ben presto rallentano la crescita, diventando progressivamente più piccoli e più deboli rispetto ai littermate, e finiscono per soccombere rapidamente nei primi giorni di vita. Nella fase sintomatica si registra una progressiva riduzione dell'alimentazione fino alla completa cessazione dell'assunzione del latte materno e l'impossibilità di mantenere una corretta postura. Monani e collaboratori (Monani et al., 2000) hanno effettuato delle conte di motoneuroni nei loro topi transgenici e non hanno riscontrato significative differenze a 1 giorno postnatale rispetto ai littermate, mentre a 5 giorni è stata riportata una perdita di circa il 40% a livello dei motoneuroni spinali e del nucleo motore faciale. Questa situazione richiama quanto già detto a proposito di altri modelli animali (Zebrafish) ed è simile a quanto si osserva nei pazienti SMA presintomatici, indicando che la perdita di motoneuroni è un evento tardivo nella progressione della malattia. Una significativa perdita di motoneuroni si verifica anche nei topi mutanti eterozigoti *Smn*^{+/-} che producono circa il 50% della proteina Smn. In questi topi il 40% dei motoneuroni vengono persi a 6 mesi di età e il 50% ad 1 anno (Jablonka et al., 2000), pur non riportando un evidente fenotipo di malattia e presentando una normale durata di vita. Quindi, sembra che la velocità con cui vengono persi i motoneuroni possa essere più importante dell'effettivo numero di motoneuroni persi nel determinare la gravità della malattia. Dal punto di vista comportamentale entrambi i gruppi di ricerca, sia di Burghes che di Li, hanno osservato che questi modelli animali non mostravano anomalie fenotipiche o debolezza muscolare, a parte la marcata necrosi delle code in prossimità dello svezzamento, che talvolta poteva estendersi, con l'avanzamento dell'età, anche ai piedi e alle orecchie (Hsieh-Li et al., 2000). Dal momento che i topi SMA che muoiono appena dopo la nascita

(*Smn*^{-/-}; poche copie di *SMN2*^{+/+}) precludono dettagliate analisi sui meccanismi patogenetici e l'esecuzione di test preclinici di farmaci, fenotipi intermedi e lievi di malattia sono stati creati per mezzo dell'aggiunta di ulteriori transgeni che esprimono varie isoforme wild-type o forme mutanti deboli di SMN (Monani et al., 2003; Le et al., 2005). Nei topi *SMN17*^{+/+};*SMN2*^{+/+};*Smn*^{-/-}, un transgene che esprime il DNA codificante per la proteina SMN mancante dell'esone 7 (*SMN17*) inserito in un mutante grave *SMN2*^{+/+};*Smn*^{-/-} ha aumentato la durata di vita da 5.2±0.2 giorni a 13.3±0.3 giorni. A partire dal 5° giorno di vita, tutti i topi mutanti erano più piccoli e pesavano meno rispetto ai corrispondenti littermate e iniziavano ad avere difficoltà nella deambulazione e nel mantenimento della posizione eretta, mostrando un'andatura anomala e instabilità degli arti inferiori (Le et al., 2005). A 2 settimane dalla nascita le analisi istologiche sui muscoli scheletrici non hanno mostrato evidenze di fibre distrofiche, ma è stata descritta atrofia con evidente denervazione a livello delle giunzioni neuromuscolari e una riduzione dei recettori per l'acetilcolina. Inoltre, il numero dei motoneuroni, a livello del midollo spinale, era normale dopo 3 giorni di vita mentre era significativamente ridotto a 9. Questo modello di SMA di tipo intermedio è stato utilizzato in studi preclinici per determinare l'efficacia di possibili terapie (Le et al., 2005). Monani e collaboratori hanno riportato la creazione di un modello murino di SMA lieve (*SMNA2G*^{+/-};*SMN2*^{+/-};*Smn*^{-/-}). In questo caso, una mutazione transgenica eterozigote A2G nel gene SMN (*SMNA2G*^{+/-}) è stata espressa in un modello di SMA severa (*SMN2*^{+/-};*Smn*^{-/-}). L'introduzione del gene *SMN2* in eterozigosi si è resa necessaria poiché in assenza di *SMN2*, che produce una piccola quantità di proteina SMN full-length, il topo transgenico lieve A2G non è stato capace di prevenire la letalità embrionale dei topi *Smn*^{-/-}. Tuttavia, in presenza di *SMN2*, il transgene mutante lieve A2G ritarda significativamente l'insorgenza della

perdita di motoneuroni. I topi si presentano funzionalmente attivi con un lieve fenotipo, anomalie elettromiografiche, sprouting assonale e una durata di vita di circa 8 mesi (Monani et al., 2003).

INTRODUZIONE ALLO STUDIO

La necessità di valutare modelli animali al fine di caratterizzare in maniera più approfondita il decorso della malattia e i meccanismi che sottostanno alle diverse fasi neuropatologiche ha portato i ricercatori a creare modelli di SMA lieve (tipo III), che sono più longevi rispetto ai modelli che riproducono la forma più grave, a decorso rapido, di malattia. Come visto precedentemente, Monani e collaboratori (2003) hanno caratterizzato un modello murino di SMA III da loro genotipizzato ($SMNA2G^{+/-}; SMN2^{+/-}; Smn^{-/-}$) nel quale la durata di vita è di 8 mesi.

Durante il corso di dottorato il mio lavoro si è focalizzato nel caratterizzare, prima dal punto di vista comportamentale e poi dal punto di vista morfologico, un modello murino di SMA di tipo III, con genotipo $SMNA2G^{+/-}; SMN2^{+/+}; Smn^{-/-}$ (Laboratori Jackson; Bar Harbor, Maine, USA). Si tratta di un modello simile a quello studiato da Monani con la sola differenza dell'espressione omozigotica del transgene SMN2. Di questo nuovo modello di SMA III è stata fornita una descrizione dettagliata sia della insorgenza e della progressione di malattia, valutata attraverso adeguati test motori, che della neuropatologia, attraverso l'analisi sistematica del midollo spinale condotta al microscopio ottico.

Nella seconda parte dello studio è stata valutata l'efficacia di un trattamento terapeutico di tipo farmacologico, basato sulla somministrazione cronica di sali di litio. Il razionale alla base della scelta di eseguire la somministrazione cronica di litio risiede nella efficacia del litio nel contrastare la degenerazione del motoneurone in seguito a diversi insulti, che vanno dal deficit di autofagia (Fornai et al., 2008a; Sarkar et al., 2008; Pasquali et al., 2009; Crippa et al., 2010) all'eccitotossicità (Busceti et al., 2007; Fulceri et al., 2011).

1. MODELLO MURINO $SMNA2G^{+/-};SMN2^{+/+};SMN^{-/-}$

Lo sviluppo di questo ceppo murino è stato effettuato grazie ai lavori di due gruppi di ricerca.

L'allele mutante *Smn* è stato creato nei laboratori del Dr. Michael Sendtner dell'Università di Würzburg (Germania). La mutazione è stata effettuata grazie alla delezione dell'esone 2 del gene endogeno *Smn* murino grazie all'impiego di un vettore codificante per la neomicina e un gene *lacZ* inseriti in corrispondenza dei primi 40 nucleotidi dell'esone deletato, in modo da consentire l'espressione del gene *lacZ* nei tessuti dove *Smn* è normalmente espresso. Il costrutto è stato inserito per elettroporazione all'interno di cellule staminali embrionali E14Tg2a-IV derivate da 129P2/OlaHsd. Queste cellule staminali contenenti il costrutto genico sono state iniettate successivamente all'interno di blastocisti di topi C57BL/6, ottenendo così animali chimerici. Questi animali chimerici sono stati incrociati con topi C57BL/6 wild type per un numero svariato di generazioni.

Gli alleli transgenici, invece, sono stati creati nel laboratorio del Prof. Arthur MB Burghes della Ohio State University (USA). Per quanto riguarda il transgene *SMN2*, all'interno di un ovocita fecondato di topo FVB/N sono stati iniettati il gene *SMN2* (derivato dal clone genomico PAC215P15) e un frammento genomico *BamHI* di 35.5kb codificante per il promoter di *SMN2*, ottenendo così un animale "founder 89" che porta 1 copia del transgene *SMN2*. In modo simile, è stato microiniettato all'interno di un ovocita fecondato di topo FVB/N il cDNA umano di *SMN1* che porta la mutazione missenso A2G sotto il controllo del promoter di *SMN1* umano, ottenendo un animale "founder 2023" che possiede 11 copie del transgene *SMNA2G*. L'animale founder 89 è stato fatto accoppiare con topi eterozigoti per la mutazione del gene endogeno *Smn* murino, ottenendo animali doppi mutanti. Questi doppi

mutanti sono stati fatti a sua volta accoppiare con i topi founder 2023 portatori dell'allele transgenico SMNA2G. Il triplo mutante è stato successivamente reincrociato con topi FVB/N wild-type per almeno 6 generazioni.

Nel topo triplo mutante $SMNA2G^{+/-}; SMN2^{+/-}; Smn^{-/-}$ il gene *Smn* murino, localizzato sul cromosoma 13, e i due transgeni *SMNA2G* e *SMN2* segregano indipendentemente in quanto l'inserzione all'interno del genoma murino è avvenuta casualmente.

Il mantenimento della colonia è stato effettuato mediante l'incrocio di: a) un topo omozigote sia per il transgene *SMN2* che per il transgene *SMN1A2G* ed eterozigote per la mutazione *Smn* e b) un topo omozigote per il transgene *SMN2* ed eterozigote per la mutazione *Smn*. Questo incrocio produce un fenotipo SMA di tipo III, con genotipo: $SmnI^{tm1Msd}/SmnI^{tm1Msd}$ Tg(SMN1*A2G)2023Ahmb/0 Tg(SMN2)89Ahmb/Tg(SMN2)89Ahmb, con frequenza 1:4.

2. LITIO E NEUROPROTEZIONE

Il litio è un composto impiegato da anni nel trattamento dei disturbi dell'umore e, in particolare, come stabilizzatore dell'umore nella terapia farmacologica delle sindromi bipolari (Manji and Lenox, 1998). Più recente è la scoperta del ruolo neuroprotettivo del litio in diversi modelli di malattie neurodegenerative (Chuang et al., 2002), tra cui l'ischemia cerebrale (Cappuccio et al., 2005), la tossicità da kainato (Busceti et al., 2007) e la malattia di Huntington (Sarkar et al., 2008). In particolare, in questi ultimi anni lo studio dell'effetto neuroprotettivo del litio ha portato alla scoperta che il trattamento cronico con sali di litio ha una potente azione protettiva nei confronti della sclerosi laterale amiotrofica (SLA), una malattia causata dalla degenerazione dei motoneuroni (Rosen et al., 1993). Questo importante effetto neuroprotettivo è stato dimostrato in modelli animali (vale a dire, nel topo

transgenico G93A) (Shin et al., 2007; Feng et al., 2008; Fornai et al., 2008a), e replicato da uno studio pilota condotto su pazienti (Fornai et al., 2008a) nei quali il trattamento cronico con sali di litio ha prodotto un marcato cambiamento nella storia di malattia, ritardando l'insorgenza e la progressione dei sintomi, e aumentando la sopravvivenza. L'effetto neuroprotettivo ottenuto con il trattamento con litio è stato inoltre documentato attraverso una dettagliata analisi morfologica condotta sia a livello del midollo spinale (Fornai et al., 2008a,b) che a livello dei nuclei motori dei nervi cranici (Ferrucci et al., 2010). D'altra parte, dall'analisi della letteratura corrente si evince che il litio sembra svolgere una elevata azione neuroprotettiva proprio nei confronti della degenerazione dei motoneuroni (Fornai et al., 2008a,b; Calderò et al., 2010; Ferrucci et al., 2010; Fulceri et al., 2011). E' noto che il litio esplica molteplici funzioni, attraverso l'interazione con una varietà di substrati, tra cui enzimi che svolgono azioni basilari nella sopravvivenza cellulare e nella capacità della cellula di rispondere adeguatamente a stimoli esterni.

In particolare, due specifici target molecolari del litio sono l'enzima Inositolo-Monofosfatasi (IMPasi) e la Glicogeno Sintasi Chinasi-3beta (GSK-3 β).

L'IMPasi catalizza l'idrolisi di inositolo monofosfato (IP) in inositolo libero (I), che partecipa alla via di segnale del fosfatidilinositolo (PI).

Il PI, grazie a due fosforilazioni successive ad opera di due specifiche protein-chinasi, viene trasformato in fosfatidilinositolo 4,5-bifosfato (PIP₂), un fosfolipide localizzato nel foglietto interno della membrana plasmatica. L'idrolisi del PIP₂ da parte dell'enzima fosfolipasi C dà origine a due secondi messaggeri: 1) l'inositolo 1,4,5 trifosfato (IP₃) che, liberato nel citoplasma, interagisce con un suo recettore-canale e mobilita gli ioni calcio dai depositi intracellulari localizzati in specifici organuli definiti "a scambio rapido", e 2) il diacilglicerolo (DAG) che rimane legato

alla membrana plasmatica e in questa sede attiva la proteina chinasi C, che a sua volta è in grado di fosforilare una serie di substrati a livello di specifici residui di serina e/o treonina.

In particolare, l'IP₃, essendo idrofilo, diffonde nel citoplasma, dove si lega a specifici recettori posti su strutture vescicolari associate al reticolo endoplasmatico. Il recettore per l'IP₃ è un canale che, una volta aperto in seguito al legame con il suo ligando, lascia fluire gli ioni calcio dai depositi intracellulari secondo un gradiente di concentrazione. In questo modo la produzione di IP₃ è associata ad un aumento della concentrazione dello ione calcio (Ca²⁺), che nella cellula svolge molteplici funzioni tra cui la regolazione del metabolismo, della secrezione, della contrazione, dell'attività neuronale e della proliferazione (Paoletti et al., 1996). Tale aumento è comunque transitorio perché il calcio libero nel citoplasma viene rapidamente chelato da specifiche proteine che hanno il compito di controllare i livelli citoplasmatici di calcio così da prevenire fenomeni di eccitotossicità conseguenti alla presenza di un eccesso di calcio citosolico.

Il litio, già a piccole dosi, blocca il turn-over degli inositoli attraverso un meccanismo che prevede molteplici target molecolari (Figura 6). Infatti, il litio (K_i = 0,8 mM) non solo inibisce l'IMPasi (Sarkar et al., 2005) ma, nel contempo, blocca anche l'inositolo polifosfato-1-fosfatasi (IPPasi), che converte l'IP₂ in IP, e il trasportatore di membrana degli inositoli liberi (SMIT), portando così a una riduzione dei livelli intracellulari di IP₃ (Sarkar and Rubinsztein, 2006). Inoltre l'inibizione del ciclo degli inositoli da parte del litio avviene anche attraverso l'inibizione della trascrizione del gene che codifica per l'inositolo monofosfatasi 2 (Seelan et al., 2004)

A dosi più alte ($K_i \sim 2$ mM), il litio regola l'attività di un altro enzima, la glicogeno sintetasi chinasi- (GSK)- 3β (Ryves and Harwood, 2001), una proteina serina/treonina chinasi che appartiene alla via di Wnt, un'importante via di segnalazione intracellulare che regola funzioni fondamentali per la vita cellulare come la proliferazione, la migrazione, e la morte cellulare (Miller et al., 1999a; Miller, 2002). Queste due vie appena descritte modulano in maniera opposta l'autofagia, la principale via di degradazione di proteine misfolded e organelli alterati prodotti naturalmente durante la vita cellulare. Infatti l' IP_3 e la stimolazione del suo recettore sopprimono l'autofagia, così che la deplezione di IP_3 prodotta dal litio porta all'attivazione dell'autofagia (Sarkar e Rubinsztein, 2006; Criollo et al., 2007) (Figura 6). Al contrario la trasduzione del segnale nella classica via di Wnt è in grado di procedere se la GSK- 3β è inattiva, mentre uno degli effetti dell'inibizione della GSK- 3β è l'attivazione di mTOR, e quindi il blocco dell'autofagia (Sarkar et al., 2008). L'azione del litio sulla GSK- 3β si verifica per concentrazioni più elevate di quelle necessarie per l'inibizione dell'IMPasi ($K_i \sim 2$ mM) con un effetto finale di segno opposto a quello ottenuto nel primo caso, ovvero il blocco dell'autofagia (Sarkar et al., 2008) (Figura 6).

Oltre all'azione sulla via autofagica il litio agisce anche sull'espressione di alcuni importanti fattori di crescita quali il fattore di crescita dell'endotelio vascolare (VEGF) (Guo et al., 2009) e il fattore neurotrofico cervello-derivato (BDNF) (Su et al., 2009; Fukumoto et al., 2001). Inoltre il litio incrementa le cellule precursori neuronali (NPC) nel midollo spinale di ratti dopo trauma (Su et al., 2007) o in topi G93A (Fornai et al., 2008a) e induce specificamente il differenziamento delle NPC in senso neuronale (Kim et al., 2004; Fornai et al., 2008a).

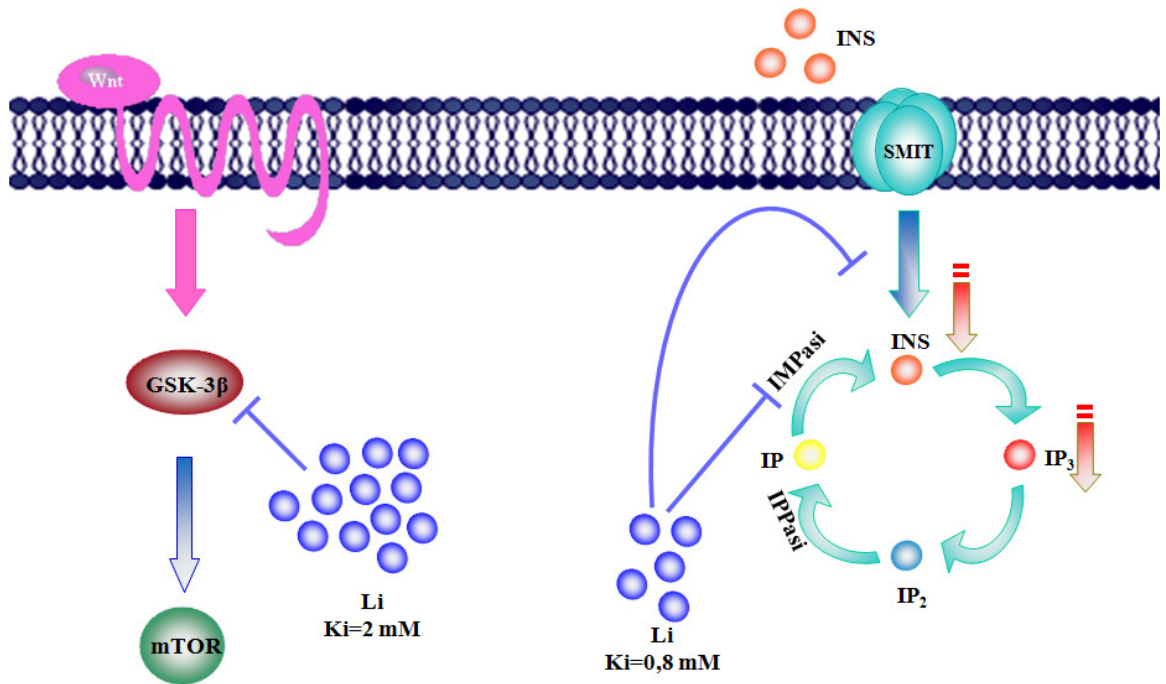


Figura 5 Principali target molecolari del litio

Il litio inibisce l'IMPasi con una $K_i = 0,8 \text{ mM}$. Questo determina una riduzione dei livelli di inositolo libero intracellulare e il blocco della sintesi di IP_3 . In questo modo, il litio riduce la concentrazione citosolica di IP_3 . Alla stessa dose, il litio inibisce l'uptake dell'inositolo libero extracellulare da parte di SMIT e blocca l'attività di IPPasi.

A concentrazioni più alte, invece, il litio inibisce l'attività della GSK-3 β ($K_i=2,00 \text{ mM}$), che a sua volta è in grado di attivare/modulare molte altre vie cellulari attraverso la sua azione su mTOR.

SCOPO DELLO STUDIO

In sintesi, lo studio condotto durante il corso di dottorato si è articolato in due fasi:

1. Nella prima fase, lo scopo principale è stato quello di caratterizzare, prima dal punto di vista comportamentale e poi dal punto di vista morfologico e istopatologico, un nuovo modello murino di SMA, con genotipo $SMNA2G^{+/-}; SMN2^{+/-}; Smn^{-/}$, paragonabile alla SMA III umana. Durante questa fase gli animali sono stati regolarmente monitorati attraverso osservazioni comportamentali, eseguite con l'impiego di diversi test motori, in modo da poter rilevare l'insorgenza di alterazioni motorie e quindi documentare l'inizio della malattia e il suo decorso temporale. Come descritto nella sezione "Materiali e Metodi", le valutazioni comportamentali hanno occupato un ampio periodo di tempo, a partire dal 60° giorno di vita fino al momento del sacrificio. Dopo il sacrificio il midollo spinale di questi topi è stato prelevato e processato per le successive indagini morfologiche. L'analisi morfologica è stata condotta in microscopia ottica convenzionale. In particolare, sono state eseguite analisi stereologiche, istochimiche, morfometriche e immunoistochimiche, allo scopo di valutare la presenza di cambiamenti nel numero, nella grandezza, nella morfologia e nella localizzazione dei motoneuroni e indagare l'immunopositività per specifiche proteine.

2. La seconda fase dello studio ha avuto come scopo la valutazione dell'efficacia neuroprotettiva del trattamento cronico con sali di litio del modello murino da noi utilizzato. Pertanto, in questa fase sono state ripetute le stesse indagini comportamentali e morfologiche descritte precedentemente, allo scopo di valutare se la somministrazione cronica di litio fosse in grado di modificare l'insorgenza e/o il decorso della sintomatologia motoria nonché le principali alterazioni istopatologiche riconducibili alla malattia.

MATERIALI E METODI

1. GRUPPI SPERIMENTALI E TRATTAMENTI FARMACOLOGICI

Topi transgenici maschi $SMNA2G^{+/-};SMN2^{+/-};Smn^{-/-}$ dell'età di 7 ± 1 settimane con i corrispondenti WT littermate sono stati ottenuti dai Laboratori Jackson (Bar Harbor, Maine, USA) e stabulati in condizioni di temperatura e luce controllate (21°C ; cicli luce/buio 12h) con accesso a cibo e acqua *ad libitum*. Dopo una settimana sono stati pesati e suddivisi nei seguenti gruppi sperimentali:

- WT (n=30);
- SMA III (n=30).

Per la caratterizzazione istopatologica sono stati impiegati n=10 animali per ogni genotipo. I restanti animali sono stati impiegati nella fase successiva dello studio, che prevedeva il trattamento con sali di litio o con salina (veicolo). In particolare, un sottogruppo di ogni gruppo sperimentale è stato selezionato per il trattamento con sali di litio, mentre i restanti animali dello stesso gruppo hanno ricevuto trattamenti con il solo veicolo (soluzione salina). Pertanto i gruppi sperimentali sono risultati così costituiti:

- WT + salina (n=10);
- WT + litio (n=10);
- SMA III + salina (n=10);
- SMA III + litio (n=10).

A partire dal 60° giorno di età degli animali hanno avuto inizio le osservazioni comportamentali attraverso l'esecuzione di appositi test. L'analisi comportamentale è stata condotta su tutti gli animali (n=60). In particolare, dal momento che negli animali dello stesso genotipo il trattamento con salina non ha prodotto effetti significativi, i dati riferiti ai topi WT e SMA III utilizzati nella I fase sperimentale

(n=10 per ogni genotipo) includono anche i dati ottenuti in topi trattati con salina e i dati riferiti ai topi WT+salina e SMA III+salina utilizzati nella II fase sperimentale (n=10 per ogni genotipo) includono anche i dati ottenuti in topi WT e SMA III non trattati.

Il trattamento, con sali di litio o con soluzione salina, è iniziato dal 68° giorno di età, quando gli animali erano ancora allo stadio pre-sintomatico. Gli animali hanno ricevuto un volume di iniezione pari a 100 µl di soluzione salina (cloruro di sodio 0,9%) o di carbonato di litio (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA) alla dose di 1 mEq/Kg di litio; le iniezioni, via i.p., sono state eseguite a giorni alterni fino al momento del sacrificio che è avvenuto quando i topi hanno raggiunto 311 giorni di età.

Gli esperimenti sono stati condotti in accordo con il Consiglio Direttivo Europeo 86/609/EEC per l'utilizzo e la cura degli animali da laboratorio.

2. ANALISI COMPORTAMENTALE

I test comportamentali, eseguiti a partire dal 60° giorno di età, hanno permesso di valutare le variazioni delle capacità motorie, come l'equilibrio, la coordinazione e la forza muscolare. In particolare sono stati eseguiti: l'hindlimb extension reflex, l'equilibrium test, lo stride length test, il Paw Grip Endurance (PaGE) test, il rotarod, il tilting test, l'analisi del tremore.

2.1 HIND LIMB EXTENSION REFLEX

E' un test che consente di valutare la perdita del riflesso di estensione degli arti posteriori, che si verifica in seguito a compromissione dell'innervazione motoria agli arti stessi. Gli animali vengono presi per la coda e sollevati, in modo da indurre una

risposta riflessa che consiste nell'estensione e nell'abduzione degli arti posteriori. A seconda del grado di estensione e abduzione degli arti è stato attribuito un punteggio arbitrario così stabilito: 2= entrambe le zampe abdote e estese; 1= una zampa abdotta e estesa mentre l'altra rimane addotta e piegata; 0= entrambe le zampe addotte e piegate. Per ogni prova, il valore ottenuto dai topi WT è stato posto uguale al 100% e i valori ottenuti dai topi SMA III sono stati espressi come percentuali rispetto ai controlli.

2.2 EQUILIBRIUM TEST

E' un test che valuta le capacità motorie di coordinazione e di equilibrio degli animali. Viene valutata, per un tempo massimo di 10 sec, la capacità del topo di rimanere in equilibrio su un'asta (larghezza di 2 cm-lunghezza di 40 cm) posta a 20 cm di altezza. L'esecuzione del test per un tempo inferiore a 10 sec è stata considerata un segno di compromissione delle capacità motorie.

2.3 STRIDE LENGHT TEST

Consente di valutare la coordinazione motoria. Gli animali vengono posti all'interno di un box (80x80x30 cm) illuminato, nel quale un corridoio delle dimensioni di 75x5 cm serve a condurli all'interno di un piccolo locale buio (20x15x10 cm). Le zampe posteriori degli animali vengono precedentemente colorate con inchiostro blu in modo che le tracce del loro spostamento possano rimanere impresse sul foglio di carta posto sul pavimento del corridoio. La lunghezza dei passi, data dalla distanza tra due impronte successive, viene successivamente misurata dallo sperimentatore. Per ogni prova è stata eseguita la media tra le tre distanze maggiori, considerate corrispondenti alla capacità motoria massima dell'animale.

2.4 PAW GRIP ENDURANCE TEST

E' un test che misura la forza muscolare. Gli animali vengono posti, uno alla volta, su una griglia, che viene agitata per indurli ad aggrapparsi alla griglia stessa. Questa viene poi lentamente capovolta e viene registrato il tempo durante il quale il topo è rimasto aggrappato alla griglia. La durata massima di ogni prova del test è stata di 30 minuti.

Per ogni topo il valore finale è stato ottenuto dalla media di tre misurazioni distinte.

2.5 ROTAROD TEST

E' un test impiegato per valutare la coordinazione motoria. Ogni topo viene messo su un cilindro rotante e viene registrato il tempo durante il quale il topo rimane in equilibrio senza cadere (fino a un tempo massimo). Nel nostro caso la velocità del cilindro è stata fissata a 15 rpm e il tempo massimo di permanenza è stato fissato a 600 sec. Per ogni animale sono state eseguite tre prove consecutive e il risultato migliore è stato registrato come dato finale.

2.6 TILTING TEST

Valuta sia l'equilibrio che la forza muscolare. Il topo viene posto su un piano che viene progressivamente inclinato. Per ogni prova viene registrato il grado di inclinazione al quale l'animale, non riuscendo più a tenersi aggrappato, scivola all'indietro.

2.7 ANALISI DEL TREMORE

Valuta il grado di tremore degli arti posteriori dei topi. Il topo viene preso con una mano mentre con l'indice dell'altra mano vengono toccate le zampe posteriori per avvertire la presenza e il grado del tremore. A seconda del tremore degli arti è stato attribuito un punteggio arbitrario così stabilito: 2= entrambe le zampe sono rilassate e non tremano; 1= una zampa trema mentre l'altra rimane rilassata oppure il tremore di ambedue le zampe è minimo; 0= entrambe le zampe tremano fortemente. Per ogni prova, il valore ottenuto dai topi WT è stato posto uguale al 100% e i valori ottenuti dai topi SMA III sono stati espressi come percentuali rispetto ai controlli.

I test motori, eseguiti da due osservatori in cieco, sono stati ripetuti per tutti i gruppi sperimentali ogni due settimane, nei giorni in cui gli animali non venivano trattati, per evitare bias dovuti all'insorgenza di abitudine e di possibili deficit motori causati dalle iniezioni.

Come parametro aggiuntivo, è stato controllato il peso corporeo.

I dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando l'analisi della varianza ANOVA in combinazione con il test *post-hoc* di Scheffè; l'ipotesi nulla è stata rifiutata per $p < 0,05$.

2. SACRIFICIO E PROCESSAZIONE DEL MIDOLLO SPINALE PER L'ANALISI IN MICROSCOPIA OTTICA

I topi sono stati sacrificati per mezzo di anestesia profonda con cloralio idrato e successiva perfusione con soluzione salina (50 ml) seguita da paraformaldeide al 4% in PBS (200 ml). Dagli animali perfusi la colonna vertebrale è stata prelevata, incisa con il bisturi e nuovamente immersa overnight nella stessa soluzione di fissativo. Quindi il midollo spinale è stato accuratamente estratto, lasciato per altre 24 ore in fissativo e, dopo essere stato suddiviso nei tratti cervicale, toracico e lombare, è stato sottoposto alla procedura sperimentale prevista per l'inclusione in paraffina.

Il protocollo di inclusione ha previsto, dopo diversi lavaggi in tampone fosfato, l'immersione dei campioni in soluzioni di alcool etilico a concentrazioni progressivamente crescenti (Et 70°, Et 80°, Et 96° e Et 100°) al fine di permettere la disidratazione del tessuto. Infine è stato effettuato un passaggio in xilolo per chiarificare e favorire la penetrazione della paraffina (Merck, temperatura di fusione 56-58°C) nella quale, al termine del processamento, sono stati immersi i campioni. Trascorse 4 ore in stufa a 56-58°C, i midolli sono stati montati in paraffina ottenendo così i blocchetti solidi utilizzabili per il taglio al microtomo.

Nel nostro studio è stato analizzato selettivamente il tratto lombare del midollo spinale, riconoscibile grazie al tipico "rigonfiamento", che appare come un evidente aumento del diametro midollare. Sezioni coronali di 8 µm di spessore ottenute da ciascun campione sono state montate su vetrini polilisinati seguendo uno stretto ordine anatomico ed utilizzate per l'analisi morfologica e immunohistochimica (immunoperossidasi e immunofluorescenza) così come descritto nel dettaglio nei paragrafi successivi.

In particolare, sezioni seriali non consecutive dedicate all'analisi morfometrica (vedi paragrafo successivo) sono state colorate con il metodo dell'ematossilina/eosina (H&E), che attraverso l'impiego in successione di un colorante basico, nel nostro caso l'emallume di Carazzi (Carlo Erba Reagents), affine a componenti cellulari basofile, (composti con caratteristiche di acidi deboli come gli acidi nucleici, alcune proteine di membrana e membrane cellulari) che appaiono di colore blu-violaceo, e quindi di un colorante acido, l'eosina (Sigma Aldrich, St. Louis, MO USA), affine a componenti acidofile (composti con caratteristiche di basi deboli, tra cui molte proteine mitocondriali e fibre collagene) che appaiono di colore rosa.

Le sezioni colorate con H&E sono state utilizzate per valutare la presenza di alterazioni morfologiche, nonché per analizzare il numero, la citoarchitettura, la morfometria e la specifica dislocazione dei motoneuroni (si veda il paragrafo successivo).

3. ANALISI MORFOLOGICA

Lo studio morfologico si è principalmente focalizzato sull'analisi degli alfa-motoneuroni, che selettivamente degenerano nella SMA.

La messa a punto di un'accurata procedura di selezione e di allestimento delle sezioni destinate all'analisi morfologica l'analisi morfologica ha rivestito un ruolo fondamentale in questo studio.

Allo scopo di restringere in modo specifico le suddette valutazioni agli alfa-motoneuroni ed evitare che lo stesso motoneurone potesse apparire più volte in sezioni diverse, abbiamo messo a punto un rigoroso metodo stereologico, che attraverso criteri basati su precisi parametri morfometrici e sulle descrizioni di anatomia microscopica e citoarchitettura del midollo spinale di topo fornite dal

testo “The spinale cord” di Watson et al. (2009). In particolare, sono state selezionate sezioni seriali non consecutive di midollo spinale, con spessore di 8 μm distanziate l’una dall’altra di 80 μm . Ciò è stato possibile attraverso l’analisi di una sezione ogni 10, per un totale di circa 120-130 sezioni per animale, corrispondenti all’intero tratto lombare del midollo spinale, che si estende per circa 1 cm. L’intervallo di 80 μm tra sezioni successive è stato scelto in quanto garantisce che lo stesso motoneurone, il cui corpo cellulare può avere un diametro compreso tra 25 e 55 μm (Watson et al., 2009), non compaia più volte all’interno di sezioni diverse (Figura 6). In questo modo, per ogni animale, il numero, il diametro e la posizione ectopica dei motoneuroni sono stati valutati per tutta l’estensione del midollo lombare.

In ciascuna sezione l’analisi tissutale è stata condotta specificamente all’interno della lamina IX, che corrisponde alla porzione di sostanza grigia del corno ventrale nella quale sono localizzati gli alfa-motoneuroni. La precisa delimitazione della lamina IX è avvenuta per mezzo del confronto con le dettagliate raffigurazioni di anatomia microscopica mostrate in Watson et al. (2009).

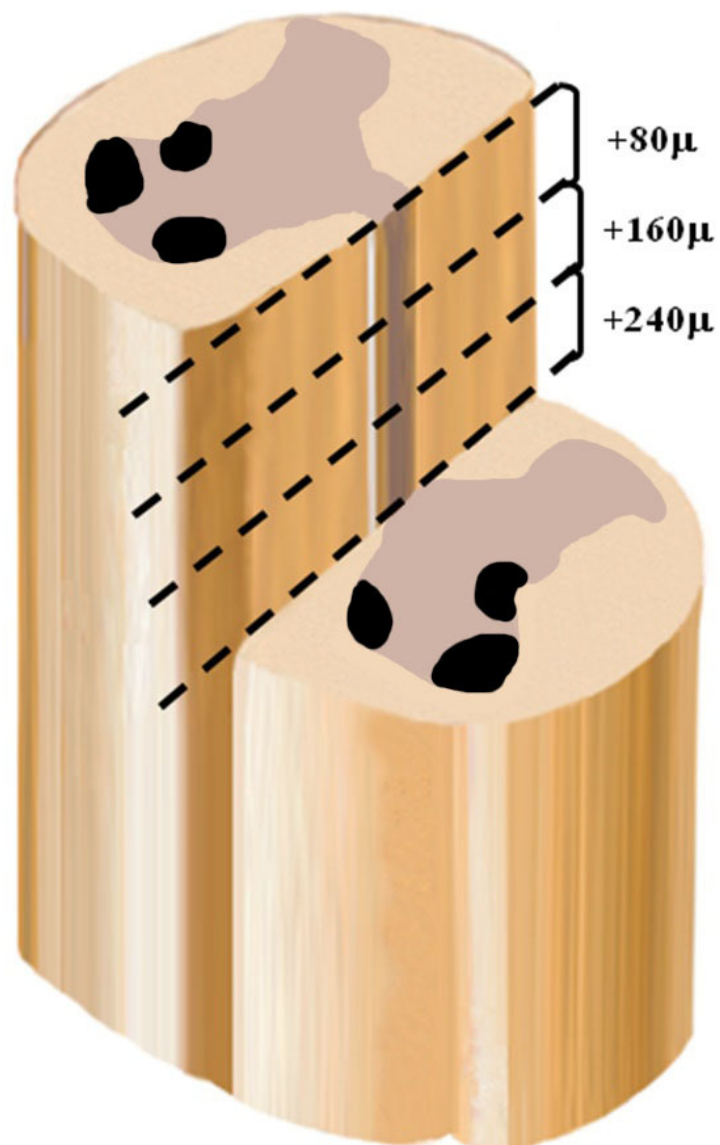


Figura 6 Criterio per l'analisi morfometrica.

Inoltre, l'esatta identificazione dei motoneuroni all'interno della lamina IX è avvenuta attraverso l'adozione di un classico criterio morfologico (cellule multipolari con nucleo non condensato e nucleolo ben evidente), in combinazione con un criterio di esclusione basato sulle dimensioni dei motoneuroni, che ci ha fatto escludere dall'analisi le cellule con un corpo cellulare di diametro inferiore a 25 μm. A tale fine è stato impiegato un software di analisi dell'immagine (Molecular Machine and

Industries & AG. Glattburgh, Switzerland), connesso con il sistema di acquisizione delle immagini al microscopio ottico, che consente di tracciare il diametro di cellule in osservazione e di leggere direttamente il valore numerico corrispondente. Questo sistema ci ha permesso di considerare in modo specifico la popolazione degli alfa-motoneuroni escludendo dalla conta altre tipologie di neuroni. Allo stesso tempo, l'uso del software ci ha permesso di misurare il diametro dei motoneuroni inclusi nell'analisi in modo da valutare se la condizione di malattia produce una variazione nelle dimensioni dei motoneuroni rispetto ai wild type, in analogia a quanto è stato dimostrato nel topo transgenico G93A, modello animale di Sclerosi Laterale Amiotrofica, nella quale si assiste alla degenerazione progressiva dei motoneuroni (Fornai et al., 2008a). Come riportato nello schema esemplificativo di fig. 9 per ogni motoneurone il diametro misurato corrisponde a un diametro intermedio tra quello minimo e quello massimo.

Infine, in analogia a quanto descritto da Simic et al. (2008) riguardo alla patologia umana, le sezioni di midollo sono state analizzate anche con l'intento di individuare la presenza di motoneuroni in sede ectopica, effetto di un'alterazione morfogenetica che è stata inclusa nella cosiddetta tetraide neuropatologica della SMA (vedi Introduzione). In particolare, sono stati considerati motoneuroni eterotopici quei motoneuroni localizzati al confine tra la sostanza grigia del corno ventrale e la sostanza bianca dei cordoni limitrofi (Figura 7).

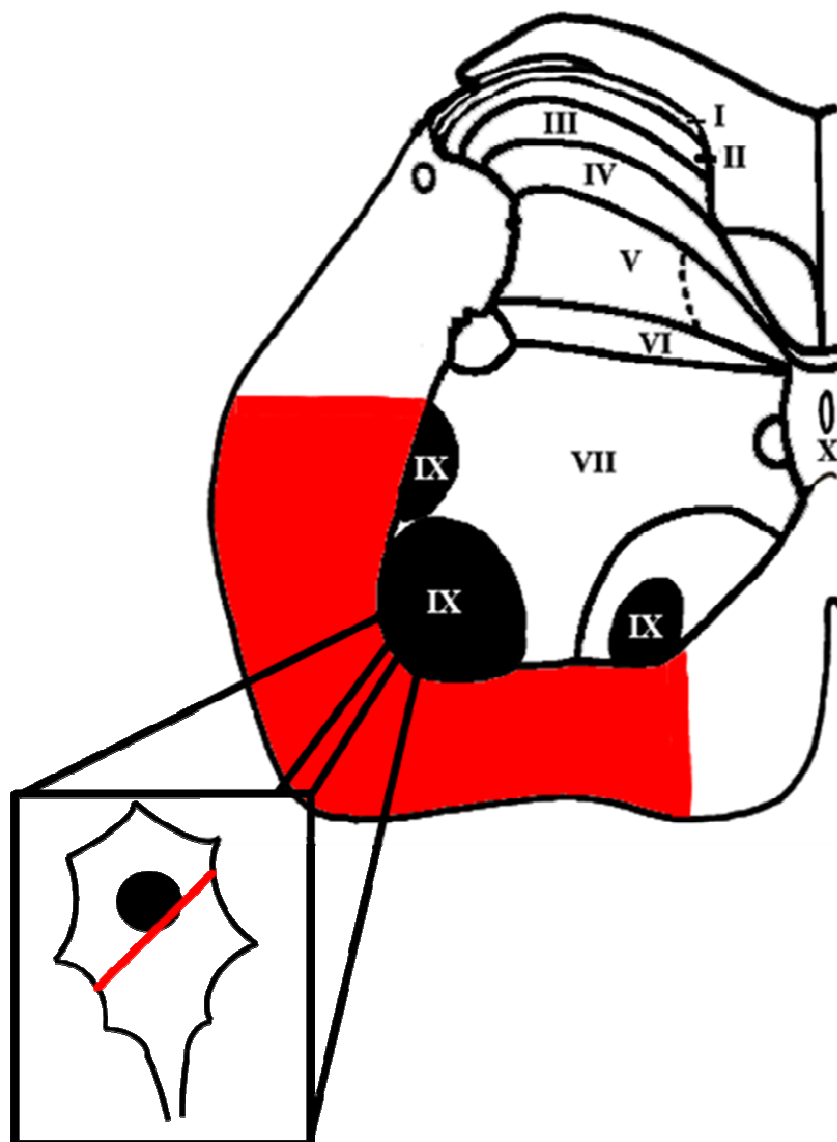


Figura 7 Localizzazione dei motoneuroni contati a livello del tratto lombare.

Riepilogando, per ogni midollo lombare analizzato sono stati valutati:

- il numero dei motoneuroni in Lamina IX
- il numero dei motoneuroni eterotopici
- il diametro dei motoneuroni

Tutte le analisi sono state effettuate al microscopio ottico Nikon Eclipse 80i, (Giappone).

I dati relativi al numero e alle dimensioni dei motoneuroni contati nel midollo lombare di ciascun topo sono stati utilizzati per ottenere un valore medio \pm SEM per ciascun animale; i valori medi relativi a ogni animale sono quindi stati impiegati per fornire il valore medio \pm SEM relativo al corrispondente gruppo sperimentale.

I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando l'analisi della varianza (ANOVA) combinata con il modello di analisi *post-hoc* Scheffè. Sono stati considerati significativi valori con $P < 0,05$.

4. ANALISI IMMUNOISTOCHEMICA

La proteina SMN è stata marcata con la tecniche immunoistochimiche, impiegando come sistema di rivelazione la fluorescenza (immunofluorescenza).

Le sezioni, dopo essere state deparaffinate, sono state permeabilizzate con Triton (Sigma Aldrich) allo 0,1%, incubate con una soluzione di siero bloccante (normal goat serum 10%, Vector Laboratories, Burlingame, CA USA) in TBS (soluzione composta da NaCl 5M e Tris HCl 1M), per 1 ora a temperatura ambiente, e successivamente incubate overnight a 4°C con una soluzione contenente l'anticorpo primario, sviluppato in mouse, diretto contro la proteina SMN (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA USA), diluito 1:50, goat serum al 2% e TBS. Il giorno seguente, dopo accurati lavaggi in TBS le sezioni sono state incubate per 1 ora e mezzo a temperature ambiente con l'anticorpo secondario fluoresceinato anti-mouse (Vector Laboratories) diluito 1:100 in TBS, montate in glicerolo e osservate al microscopio ottico (Nikon Eclipse 80i, Giappone) dotato di lampada a fluorescenza.

RISULTATI

1. CARATTERIZZAZIONE DEL MODELLO MURINO DI SMA III

1.1 ALTERAZIONI MOTORIE NEL TOPO SMA III

Tra tutti i test comportamentali effettuati sui topi, solamente il PaGE test e l'hind limb extension reflex sono stati quelli che hanno dato risultati significativi rispetto ai topi WT littermate.

In particolare il PAGE test nei topi SMA III ha mostrato un tempo di caduta significativamente inferiore rispetto ai topi WT a partire dal 215° giorno di età (Figura 8a). Questo risultato ottenuto al PAGE test rappresenta la prima alterazione motoria registrata nei topi SMA III, indicando che in questo modello la riduzione della forza muscolare è il sintomo che si manifesta più precocemente.

Per quanto riguarda l'hind limb extension reflex, i risultati ottenuti nei topi SMA III mostrano un peggioramento significativo rispetto ai corrispondenti WT littermate a partire dal 255° giorno di età, quando tale parametro si riduce nei topi SMA III al 70 % rispetto ai WT e rimane approssimativamente attorno a tale valore fino al giorno del sacrificio (Figura 8b).

Gli altri test comportamentali non hanno registrato differenze tra i topi transgenici e i topi WT per tutta la durata dell'osservazione (dati non mostrati).

Inoltre, come mostrato dalla fig. 9 per tutto il periodo di osservazione non è stata rilevata alcuna variazione significativa di peso corporeo tra i topi SMA III e i topi WT.

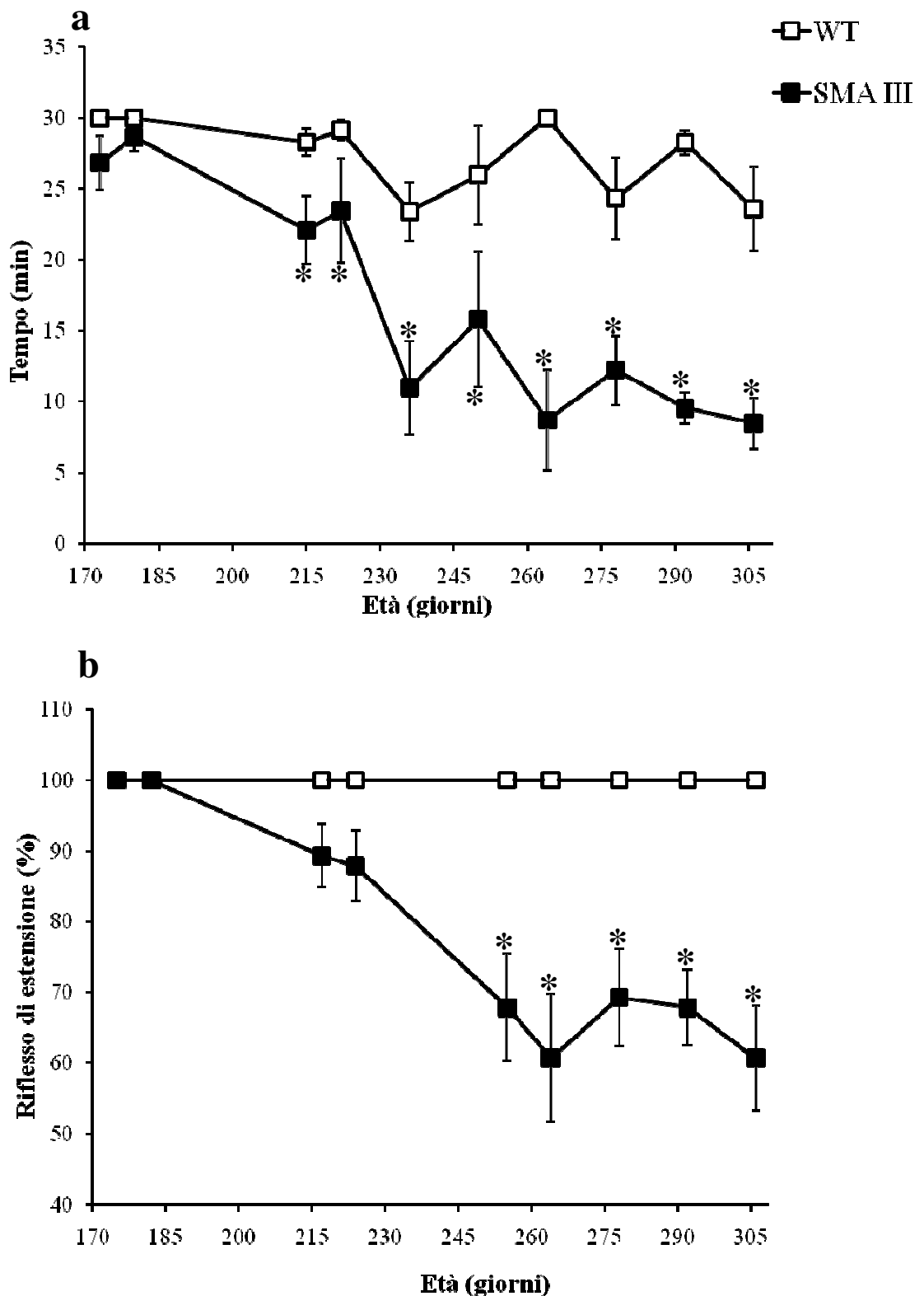


Figura 8 Test comportamentali.

(a) PaGE Test. Si noti a partire dal 215° giorno di età la progressiva riduzione del tempo di corretta esecuzione del test nei topi SMA III rispetto ai topi WT (vedere descrizione del test in Materiali e Metodi), indice di progressiva riduzione di forza muscolare. **(b) Hind limb extension reflex.** La perdita significativa del riflesso di estensione si verifica a partire dal

250° giorno di età degli animali SMA III (vedere sezione Materiali e Metodi per il significato da attribuire ai valori percentuali).

* $p < 0,05$ vs WT

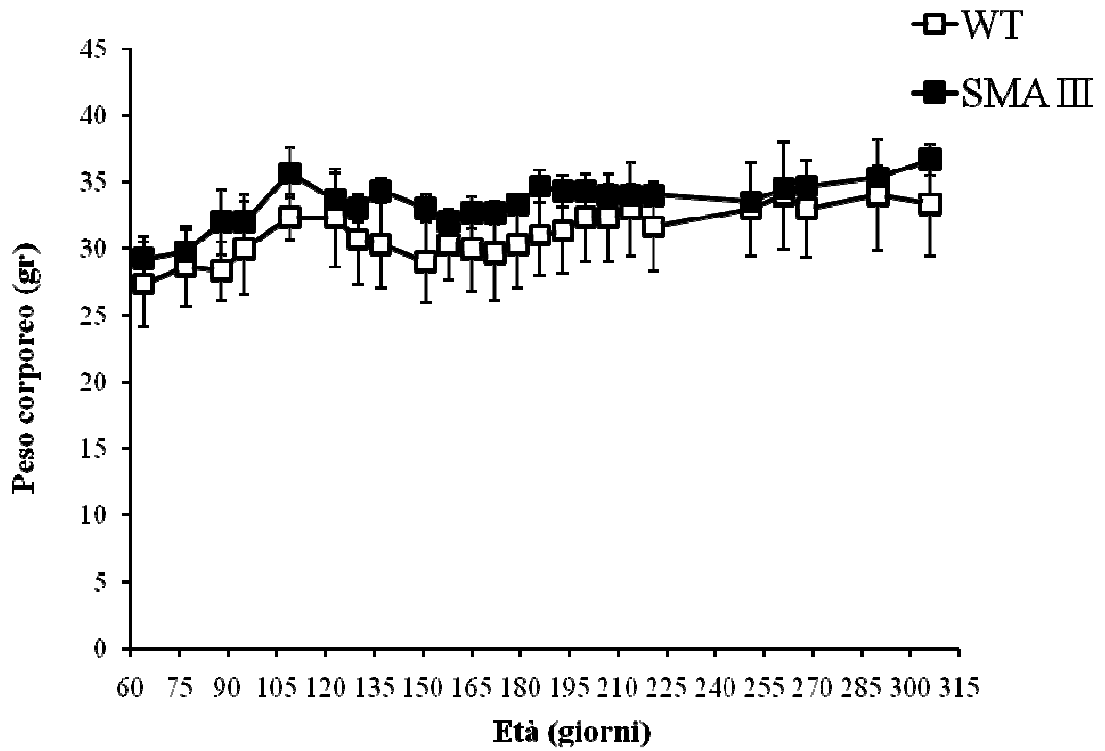


Figura 9 Peso corporeo

L'incremento di peso corporeo registrato durante l'intera sessione sperimentale negli animali SMA III è risultato in linea con l'incremento ponderale degli animali WT.

1.2 ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE E MORFOMETRICHE NEL MIDOLLO SPINALE DEL TOPO SMA III

L'analisi morfologica dei midolli lombari dei topi SMA III ha fornito una serie di interessanti dati utili alla caratterizzazione neuropatologica del modello.

Come descritto dettagliatamente nella sezione Materiali e Metodi, grazie all'impiego di un rigoroso metodo di analisi stereologica, in sezioni seriali non consecutive, colorate con H&E, sono state effettuate valutazioni morfometriche, che hanno fornito dati quantitativi relativi al numero e alle dimensioni degli alfa-motoneuroni rilevabili nel nostro modello al momento del sacrificio. Un altro parametro che è stato valutato consiste nella conta dei motoneuroni eterotopici, che appaiono localizzati al di fuori della lamina IX e, più precisamente, accolti nei cordoni di sostanza bianca limitrofi alla sostanza grigia del corno ventrale.

Già alla semplice osservazione qualitativa al microscopio ottico, le sezioni di midollo lombare provenienti dai topi SMA III mostravano una evidente perdita di motoneuroni, come mostrato in figura 10a,b. La conta del numero di alfa-motoneuroni ha confermato la presenza di una significativa riduzione di motoneuroni a livello delle corna anteriori del midollo lombare nei topi SMA III rispetto ai topi WT (Figura 10c). In particolare, come indicato nel grafico di Fig. , nei topi SMA III, al momento del sacrificio, avvenuto al 311° giorno di vita, il numero medio di motoneuroni residui per sezione di midollo spinale era ridotto al 55,22% rispetto ai controlli littermate.

In particolare, la morfologia della maggior parte dei motoneuroni residui nelle sezioni appartenenti ai topi SMA III appare marcatamente alterata, sia a livello del citoplasma che del nucleo. La fig. 11 mostra il tipico aspetto di un motoneurone, così come appare in un animale di controllo, e un motoneurone rappresentativo di un

animale SMA III, al 311° giorno di vita. Rispetto al controllo, il motoneurone appartenente al topo transgenico SMA III ha una morfologia fortemente alterata, caratterizzata da una evidente irregolarità della forma cellulare, che tende a perdere la tipica multipolarità per assumere un aspetto vagamente rotondeggiante o ovalare, in cui i processi cellulari non sono evidenti, il citoplasma appare più diluito rispetto al controllo e il nucleo, fatta eccezione per il nucleolo, risulta non distinguibile rispetto al citoplasma circostante.

La misurazione del diametro dei motoneuroni ha dimostrato che nei topi SMA III il corpo cellulare dei motoneuroni presenta dimensioni significativamente maggiori rispetto a quello dei motoneuroni dei topi WT (Figura 12a,b). L'aumento delle dimensioni dei motoneuroni nei topi SMA III appare strettamente correlato alla loro marcata alterazione morfologica che, attraverso l'assunzione di una atipica morfologia rotondeggiante, risulta in un aumento del diametro cellulare (Figura 12c). Infine, in analogia a quanto descritto nella malattia umana (Simic et al., 2008), anche nei topi SMA III sono stati individuati motoneuroni eterotopici, localizzati al confine tra la sostanza grigia del corno ventrale e i limitrofi cordoni di sostanza bianca (Figura 13a,b). Dalla conta cellulare è risultato che nei topi SMA III il numero di motoneuroni eterotopici per sezione è significativamente più elevato rispetto ai WT, rappresentando circa il 6,97% di tutti i motoneuroni residui (Figura 13c).

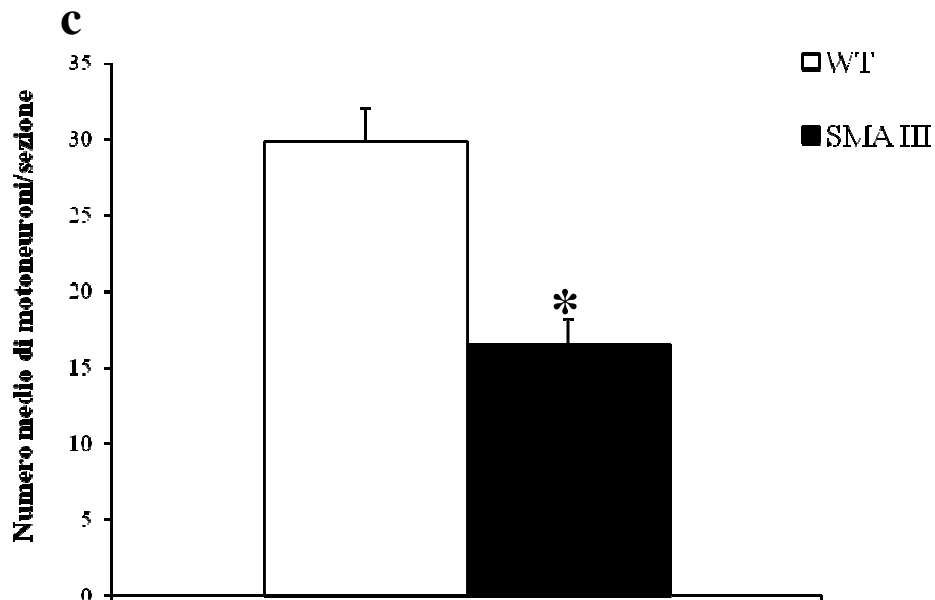
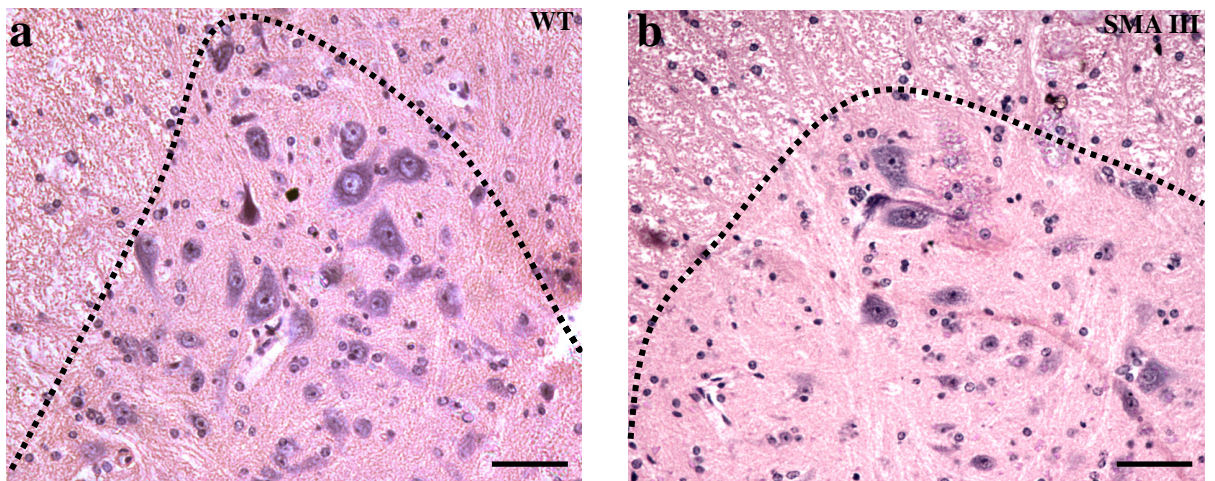


Figura 10 Perdita di motoneuroni nel corno ventrale di midollo lombare nei topi SMA III

a) Immagine rappresentativa di una sezione di midollo lombare di un topo WT, che mostra motoneuroni localizzati nella sostanza grigia del corno ventrale.

b) Motoneuroni del corno ventrale di una sezione di midollo lombare ottenuta da un topo SMA III. Si noti l'evidente riduzione di densità dei motoneuroni nel topo SMA III rispetto al topo WT, confermata dalla conta stereologica, eseguita su un totale di 125 sezioni per animale, e mostrata nel grafico in **c)**. Il tratteggio mostrato in **a)** e **b)** indica il confine del corno ventrale rispetto alla sostanza bianca.

* $p < 0,05$ vs WT

Scala: 1cm = 65 μ m

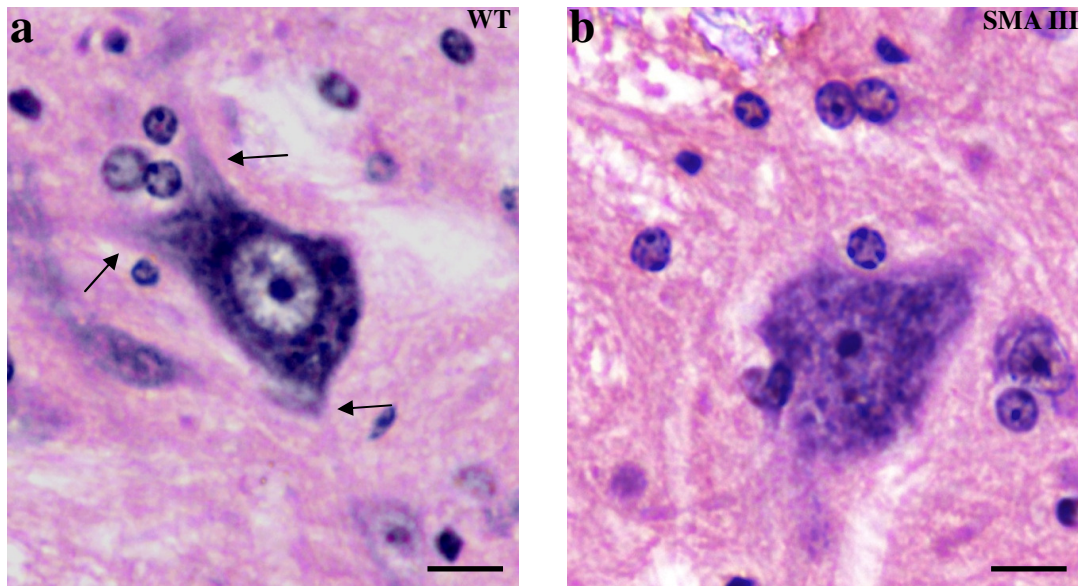


Figura 11 Alterazione morfologica del motoneurone nei topi SMA III

a) Motoneurone rappresentativo di un topo WT con corpo cellulare multipolare, citoplasma intensamente basofilo, nucleo chiaro e nucleolo ben evidente. Le frecce indicano i prolungamenti che emergono dal corpo cellulare.

b) Nel topo SMA III la morfologia del motoneurone appare profondamente alterata. Si noti la perdita della classica forma multipolare, la riduzione della basofilia citoplasmatica e la condensazione della cromatina nucleare che rende scarsamente evidenziabile il nucleo rispetto al citoplasma.

Scala: 1cm=12 μ m

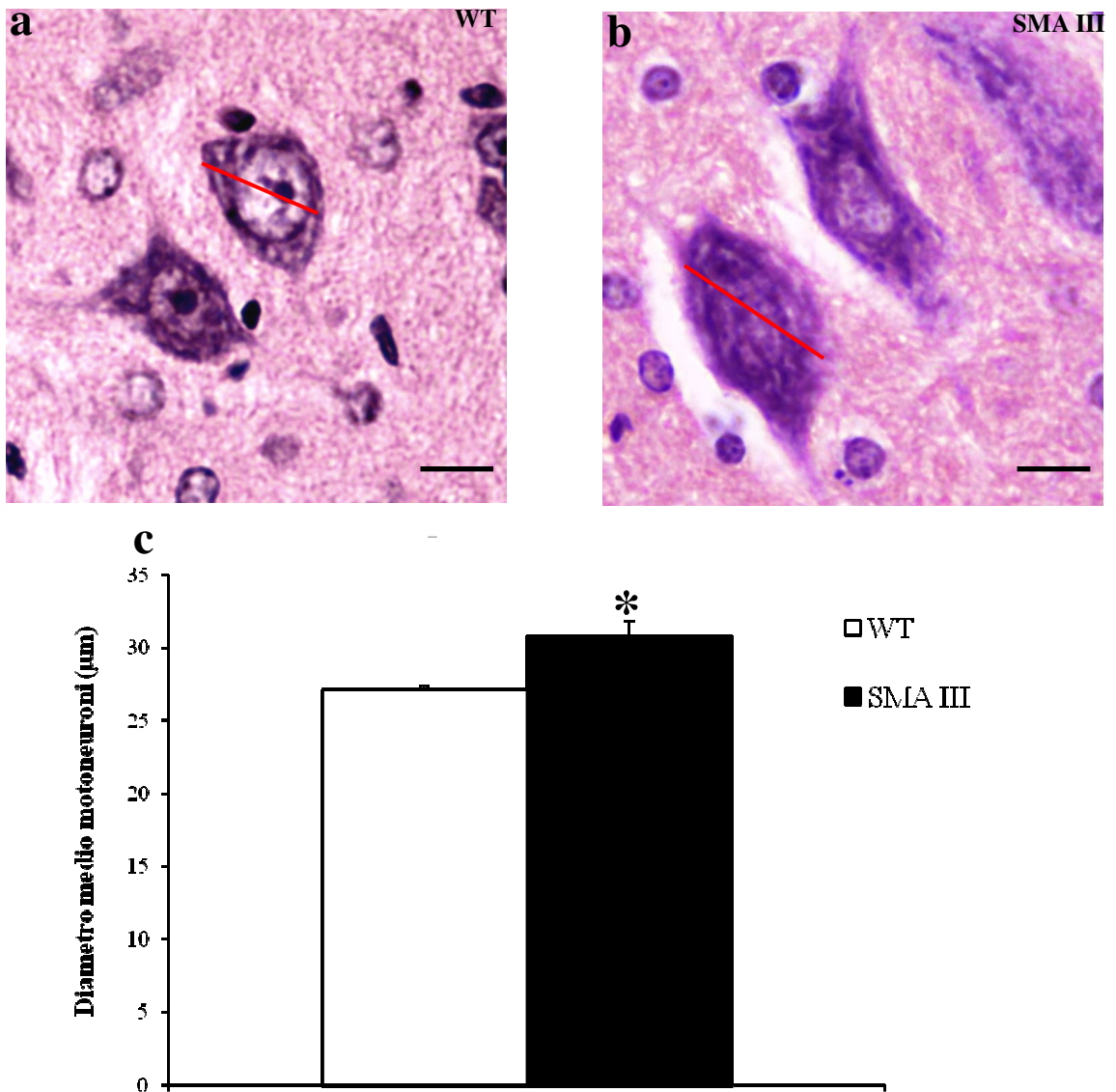


Figura 12 Aumento delle dimensioni dei motoneuroni nei topi SMA III rispetto ai topi WT.

a) Motoneuroni di topi WT ad alto ingrandimento. b) Motoneuroni di topo SMA III ad alto ingrandimento. c) Il grafico mostra l'aumento significativo dei diametri medi dei motoneuroni dei topi SMA III rispetto ai topi WT, misurati come descritto nella sezione "Materiali e Metodi". In particolare, le linee rosse riportate in a) e b) rappresentano le linee tracciate per misurare i diametri cellulari.

* $p < 0,05$ vs WT

Scala: 1cm = 18µm

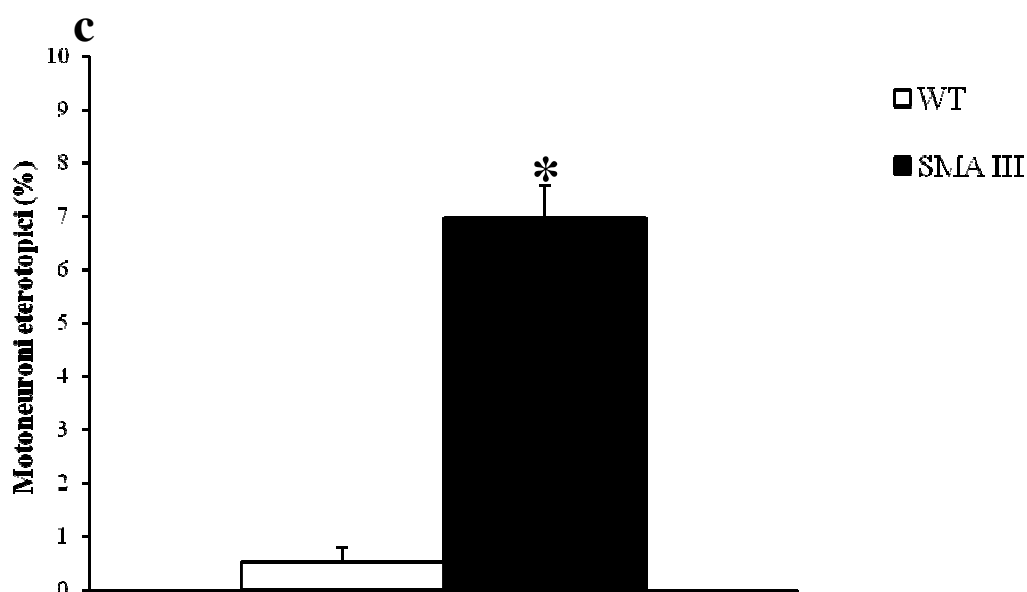
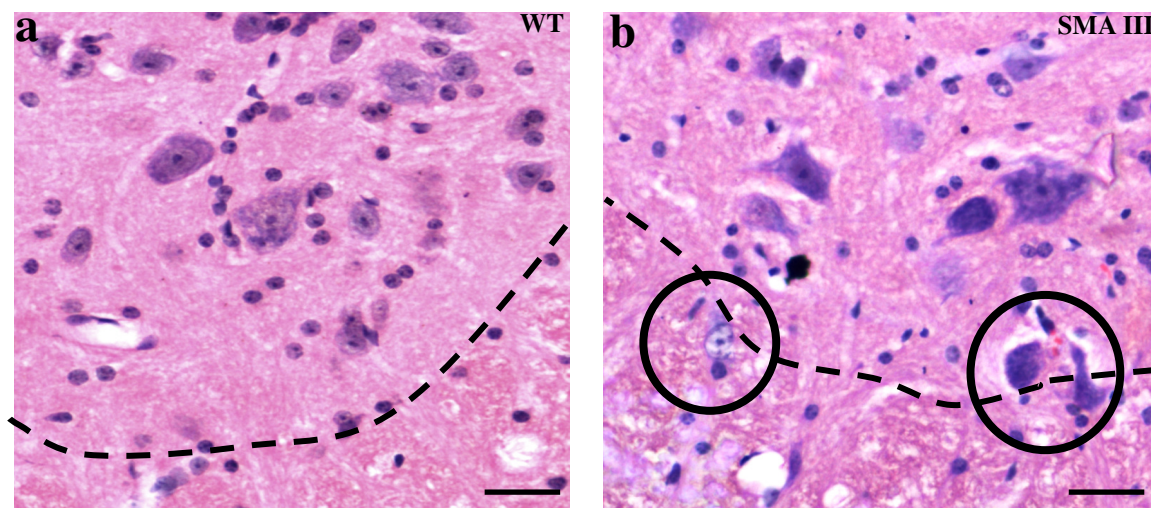


Figura 13 Presenza di motoneuroni eterotopici nei topi SMA III

a) Immagine rappresentativa di una sezione di midollo lombare di un topo WT, che mostra motoneuroni normalmente localizzati all'interno della sostanza grigia del corno ventrale b) Motoneuroni del corno ventrale di una sezione rappresentativa di midollo lombare ottenuta da un topo SMA III. I motoneuroni all'interno delle due aree circolari si trovano: al confine tra la sostanza grigia e la sostanza bianca (destra); completamente accolto nella sostanza bianca (sinistra). c) Il grafico mostra la percentuale di motoneuroni eterotopici (localizzati nella sostanza bianca limitrofa al corno ventrale) trovati nel midollo lombare dei topi SMA III e dei topi WT rispetto ai motoneuroni totali. Il tratteggio mostrato in a) e b) indica il confine del corno ventrale rispetto alla sostanza bianca.

* $p < 0,05$ vs WT

Scala: 1cm = 45 μ m

1.3 IMMUNOPOSITIVITÀ PER LA PROTEINA SMN

L'analisi immunohistochimica ha rivelato una diversa distribuzione dell'immunofluorescenza per la proteina SMN nei topi SMA III rispetto ai WT. Infatti, mentre nei topi WT l'immunopositività per la proteina SMN appare distribuita diffusamente nel citosol e in piccola parte anche nel nucleo (Figura 14a), nei topi SMA III la proteina SMN appare sottoforma di voluminosi aggregati a localizzazione citosolica, mentre non si osservano segnali nucleari (Figura 14b).

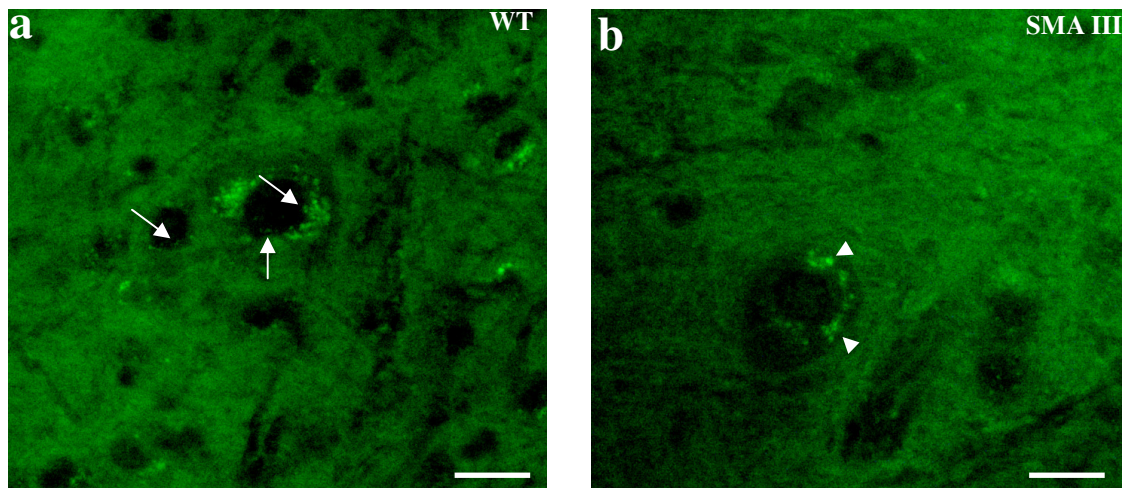


Figura 14 Immunopositività per SMN nei topi SMA III rispetto ai topi WT.

a) Immagine rappresentativa dell'immunopositività per la proteina SMN in motoneuroni di un topo WT, distribuita diffusamente nel citoplasma e in piccole tracce nel nucleo (freccia).

b) Nei motoneuroni di un topo SMA III l'immunopositività per SMN appare sottoforma di grossi aggregati (punte di freccia), localizzati per lo più nel citoplasma.

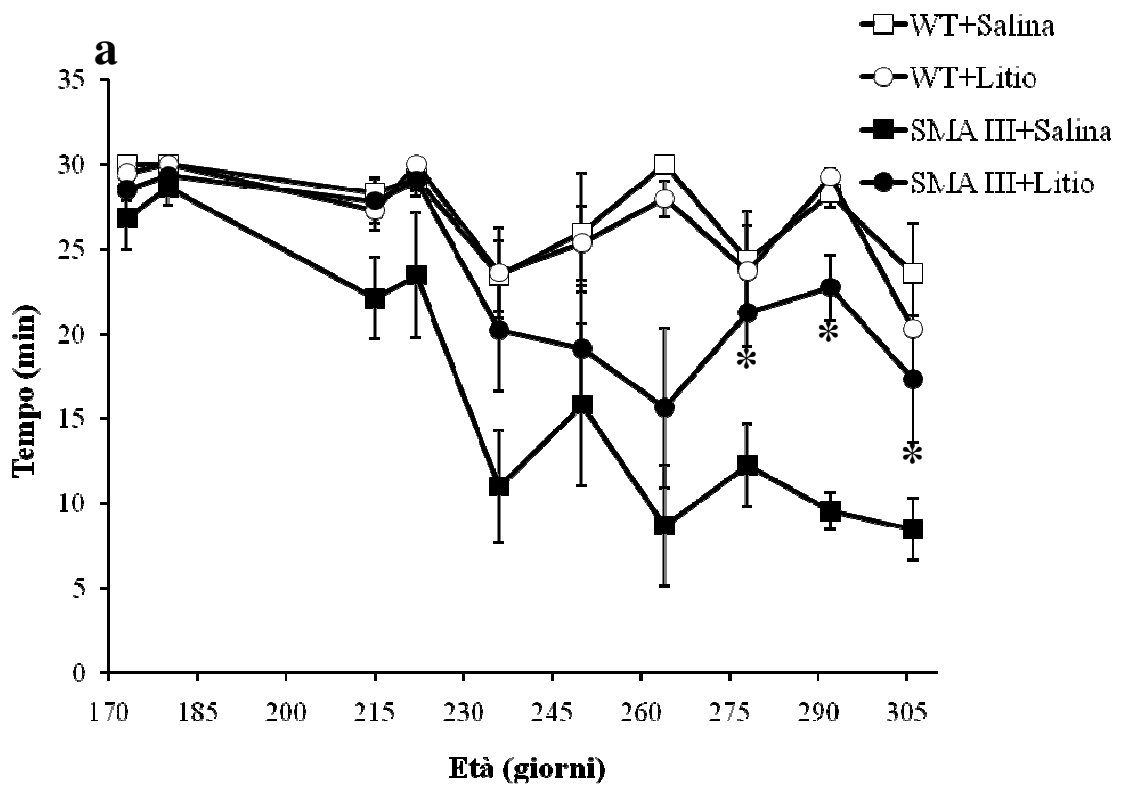
Scala: 1cm = 23 μ m

2. VALUTAZIONE DEGLI EFFETTI DEL LITIO SUL MODELLO MURINO DI SMA III

2.1 IL LITIO RITARDA L'INSORGENZA DEI DEFICIT MOTORI NEL TOPO SMA III

L'esecuzione dei test comportamentali ha rivelato una significativa attenuazione della compromissione motoria nel gruppo di topi SMA III trattati con litio rispetto ai topi SMA III non trattati. In particolare, nei topi SMA III non trattati il PaGE test a partire dal 215° giorno di età era del $78,09 \pm 8,55\%$ rispetto ai topi WT e al momento del sacrificio era ulteriormente ridotto al $35,98 \pm 7,73\%$ rispetto ai topi WT mentre l'hind limb extension reflex risultava alterato a partire dal 255° giorno di età ($67,86 \pm 7,63\%$ rispetto ai WT) mantenendosi intorno a tale valore fino al momento del sacrificio ($60,71 \pm 7,43\%$ rispetto ai WT); nei topi SMA III trattati con litio si è osservato un ritardo nell'insorgenza del deficit di forza muscolare di 49 giorni rispetto ai topi SMA III non trattati, mentre l'hind limb extension reflex è insorto allo stesso giorno (255° giorno di età) dei topi SMA III non trattati, rispetto ai quali ha registrato una alterazione di entità minore, con una riduzione del $80,5 \pm 7,54\%$ rispetto ai WT (Figura 15a,b). Nel corso della malattia il deficit di forza muscolare, che nei topi SMA III non trattati è andato incontro a progressivo peggioramento, nei topi SMA III trattati con litio si è mantenuto significativamente più lieve rispetto ai topi non trattati, fino al momento del sacrificio (Figura 15a). Infine, come per i topi SMA III non trattati, anche nei topi SMA III trattati con litio l'hind limb extension reflex non ha subito variazioni significative nel corso della malattia, pur mantenendosi a valori significativamente più elevati rispetto agli animali non trattati (Figura 15b). Come per i topi SMA III non trattati, anche nei topi SMA III trattati con litio gli altri test comportamentali non hanno rivelato alcuna compromissione motoria (dati non

mostrati). Inoltre, il trattamento con litio non ha prodotto effetti sull'incremento di peso corporeo rispetto ai topi SMA III, né rispetto ai WT littermate (Figura 16).



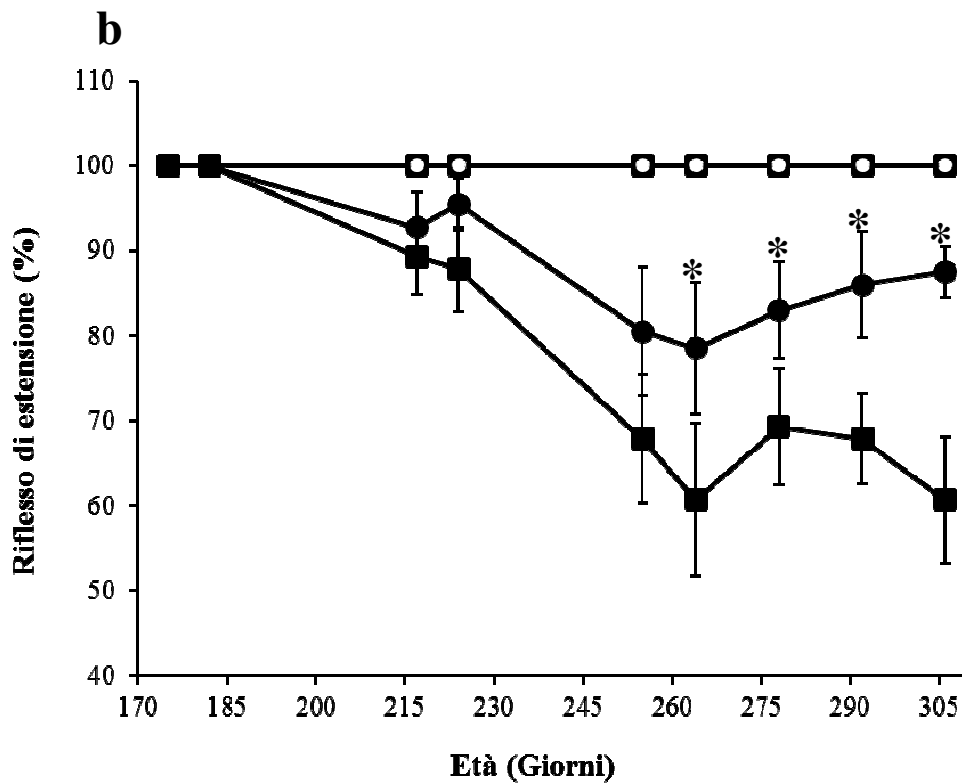


Figura 15 Test comportamentali.

(a) PaGE Test. Si noti a partire dal 278° giorno di età un significativo recupero del tempo di corretta esecuzione del test nei topi SMA III trattati con litio rispetto ai topi SMA III non trattati (vedere descrizione del test in Materiali e Metodi), indice di un recupero di forza muscolare che rimane paragonabile a quella dei topi WT. **(b) Hind limb extension reflex.** La perdita significativa del riflesso da parte dei topi SMA III non trattati viene recuperata dai topi SMA III trattati con litio a partire dal 264° giorno di età (vedere sezione Materiali e Metodi per il significato da attribuire ai valori percentuali).

* $p < 0,05$ vs SMA III non trattati

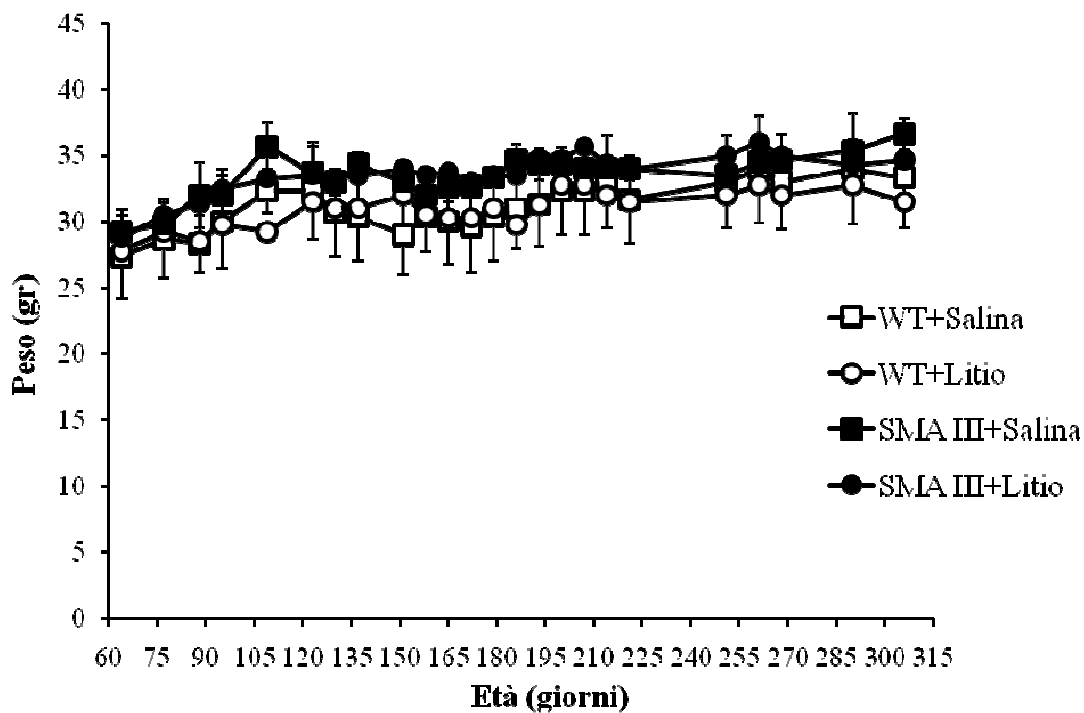


Figura 16 Peso corporeo

L'incremento di peso corporeo registrato durante l'intera sessione sperimentale è risultato costante in tutti i gruppi sperimentali, sia WT che SMA III.

2.2 *IL LITIO ATTENUA LE ALTERAZIONI ISTOPATOLOGICHE E MORFOMETRICHE NEL MIDOLLO SPINALE DEL TOPO SMA III*

L'analisi morfologica condotta nel midollo lombare dei topi SMA III trattati cronicamente con litio ha dimostrato una chiara attenuazione dei principali cambiamenti morfologici e morfometrici che sono stati descritti come elementi caratterizzanti l'istopatologia del topo SMA III.

Dalla conta degli alfa-motoneuroni nel corno ventrale, condotta secondo gli stessi criteri stereologici descritti precedentemente, è emerso che nei topi SMA III trattati con litio la perdita dei motoneuroni a livello del midollo lombare è significativamente ridotta rispetto ai topi SMA III trattati con salina (Figura 17e).

Inoltre, la morfologia dei motoneuroni residui nei topi SMA III trattati con litio conserva in gran parte le caratteristiche morfologiche e morfometriche dei motoneuroni WT. Infatti, come mostrato nell'immagine rappresentativa di Figura 18, i motoneuroni appartenenti a sezioni di topi SMA III trattati con litio presentano i caratteri tipici dei motoneuroni dei topi di controllo (corpo cellulare di forma multipolare, citoplasma intensamente basofilo, nucleo chiaro e nucleolo ben evidente). La preservazione della morfologia dei motoneuroni è confermata dalle misurazioni dei diametri dei corpi cellulari, che nei topi SMA III trattati con litio non differiscono rispetto ai controlli (Figura 19). Infine, il trattamento cronico con litio dei topi SMA III è risultato efficace anche nel ridurre significativamente la localizzazione eterotopica dei motoneuroni nella sostanza bianca limitrofa al corno ventrale osservata nei topi SMA III non trattati (Figura 20).

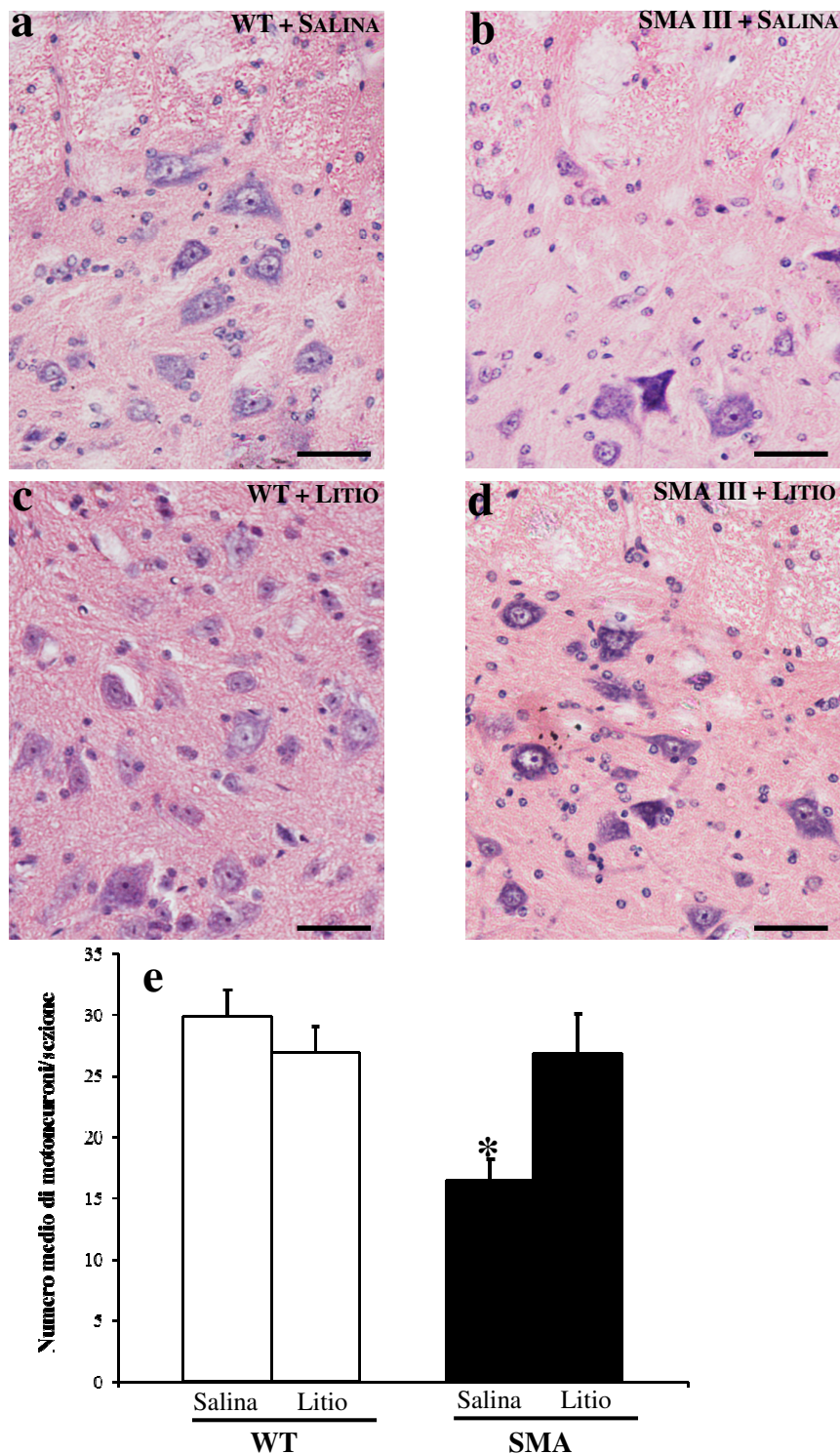


Figura 17 Il trattamento con litio previene la perdita di motoneuroni nei topi SMA III. Immagini rappresentative di sezioni di midollo lombare di topi WT **a**) e SMA III **b**), in cui è evidente la perdita di motoneuroni rispetto al controllo. Sezioni di midollo lombare di topi WT e SMA III che hanno ricevuto il trattamento con litio sono mostrate in **c**) e **d**), rispettivamente. Si noti come nel topo SMA III il litio produca una notevole preservazione del numero di motoneuroni, che appaiono a una densità simile a quella del topo WT. **e**) Grafico che riporta la conta dei motoneuroni per sezione (vedi Materiali e Metodi)

* $p < 0,05$ vs gli altri gruppi

Scala: 1cm = 55 μ m

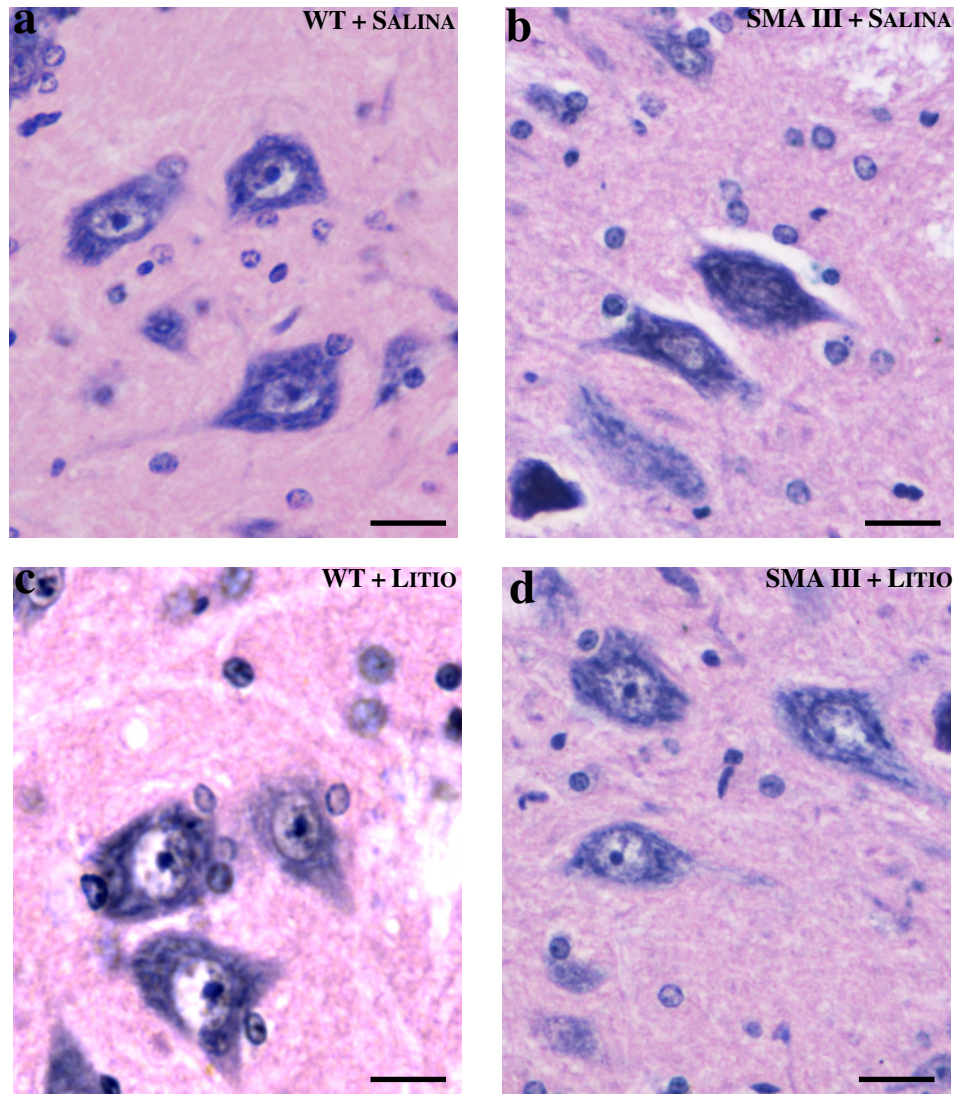


Figura 18 Il trattamento con litio preserva la morfologia dei motoneuroni nei topi SMA III

Immagini rappresentative di motoneuroni di topi WT e SMAIII trattati con salina (**a** e **b**, rispettivamente) e trattati con litio (**c** e **d**, rispettivamente). Rispetto ai motoneuroni di topi SMA III trattati con salina, che appaiono morfologicamente alterati, con perdita della classica forma multipolare, riduzione della basofilia citoplasmatica e condensazione della cromatina nucleare (**b**), il trattamento con litio preserva la normale morfologia dei motoneuroni nel topo SMA III, che mostrano una caratteristica forma multipolare del corpo cellulare, citoplasma basofilo, nucleo chiaro e nucleolo ben evidente.

Scala: 1cm = 25µm

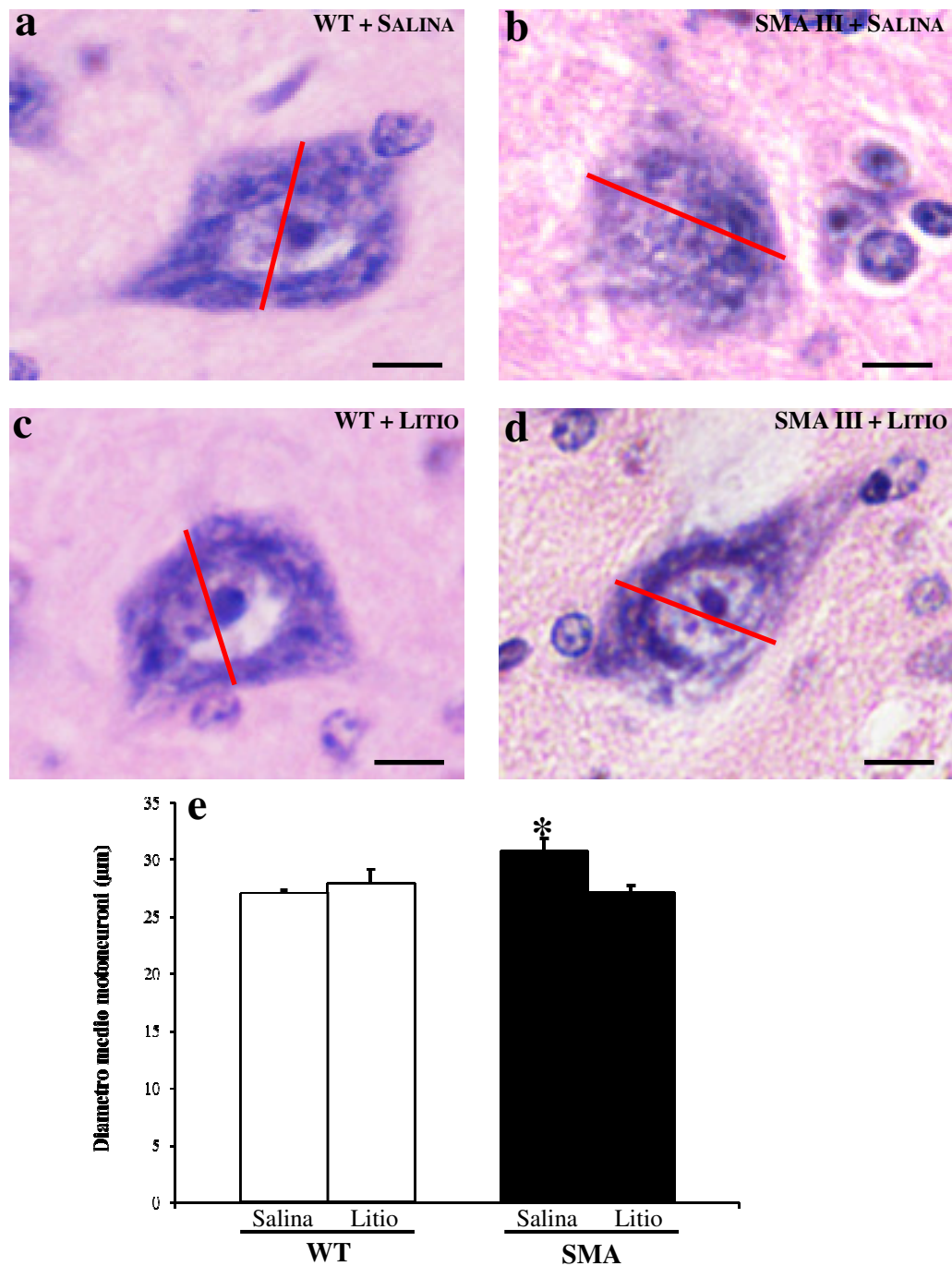


Figura 19 Il trattamento cronico con litio previene l'aumento delle dimensioni dei motoneuroni di topi SMA III

Immagini rappresentative ad alto ingrandimento di un motoneurone di topi WT e SMA III trattati con salina (a e b, rispettivamente) e trattati con litio (c e d, rispettivamente). Si noti come il trattamento con litio mantenga le normali dimensioni del motoneurone nel topo SMA III rispetto ai motoneuroni di topi SMA III trattati con salina (b). Il grafico in (e) riporta i valori medi dei diametri dei motoneuroni misurati come descritto in Materiali e Metodi. La linea rossa tracciata in a-d indica il diametro effettivamente misurato in ogni motoneurone.

* $p < 0,05$ vs gli altri gruppi

Scala: 1cm = 10µm

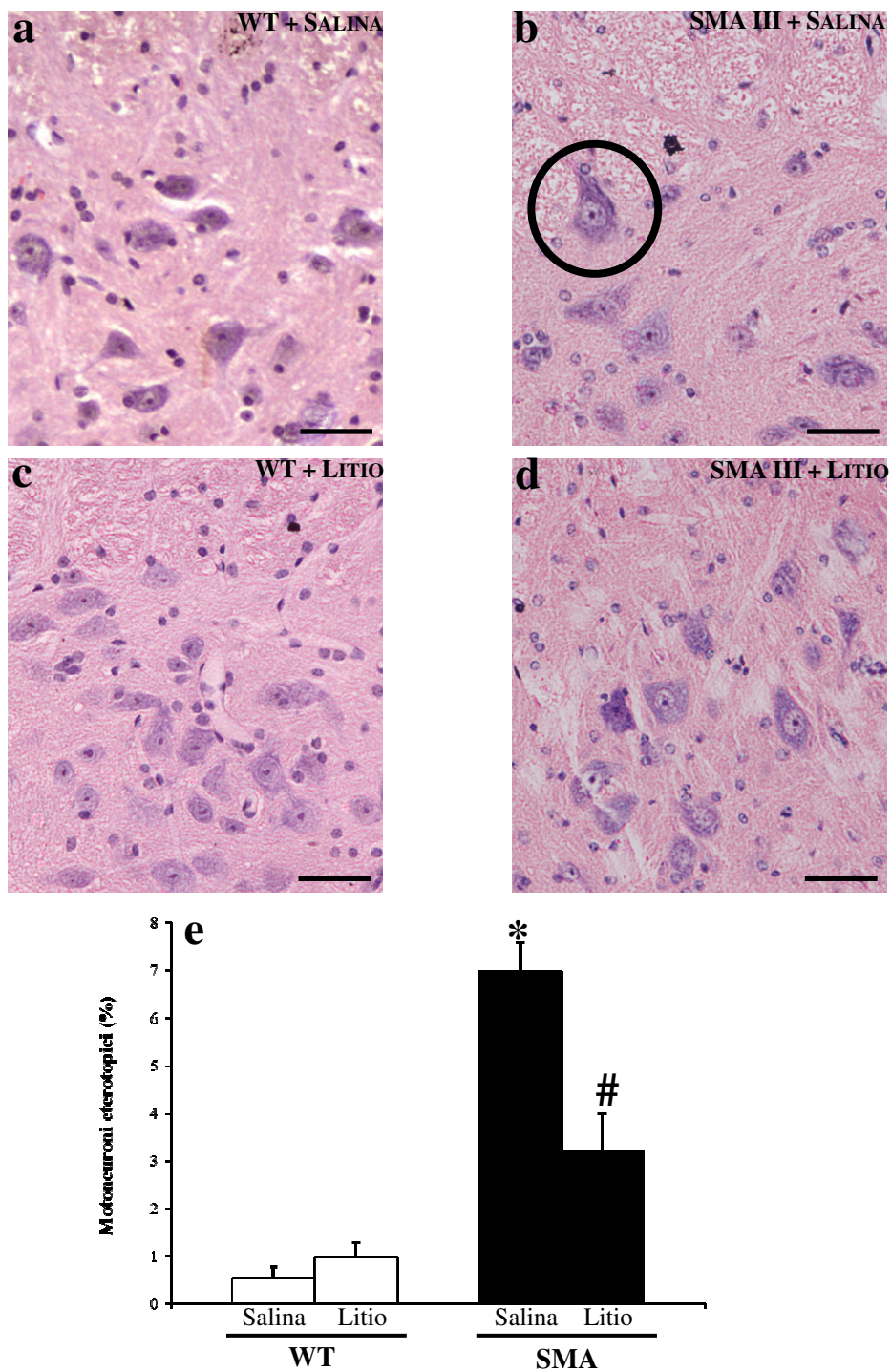


Figura 20 Il trattamento con litio riduce significativamente il numero di motoneuroni eterotopici nei topi SMA III

Immagini rappresentative di sezioni di midollo lombare di topi WT (a) e SMA III (b), dove un motoneurone eterotopico, al confine tra la sostanza grigia e la sostanza bianca, appare cerchiato, mentre i motoneuroni di topi WT e SMA III trattati con litio sono riportati in c e d. Il grafico in e) riporta la conta dei motoneuroni eterotopici effettuata come descritto in Materiali e Metodi.

* $p < 0,05$ vs altri gruppi; # $p < 0,05$ vs WT

Scala: 1cm = 65 μ m

2.3 *IL LITIO MODIFICA L'IMMUNOPOSITIVITÀ PER LA PROTEINA SMN NEL TOPO SMA III*

Analogamente ai parametri morfologici e morfometrici analizzati precedentemente, il trattamento con litio dei topi SMA III ha prodotto degli effetti anche sull'immunopositività per la proteina SMN. Come mostrato in figura 21, l'immunofluorescenza per la proteina SMN nei topi SMA III trattati con litio è diffusa all'interno del motoneurone, dove appare sia nel citoplasma che all'interno del nucleo, in modo simile a quanto si osserva nei topi WT (Figura 21).

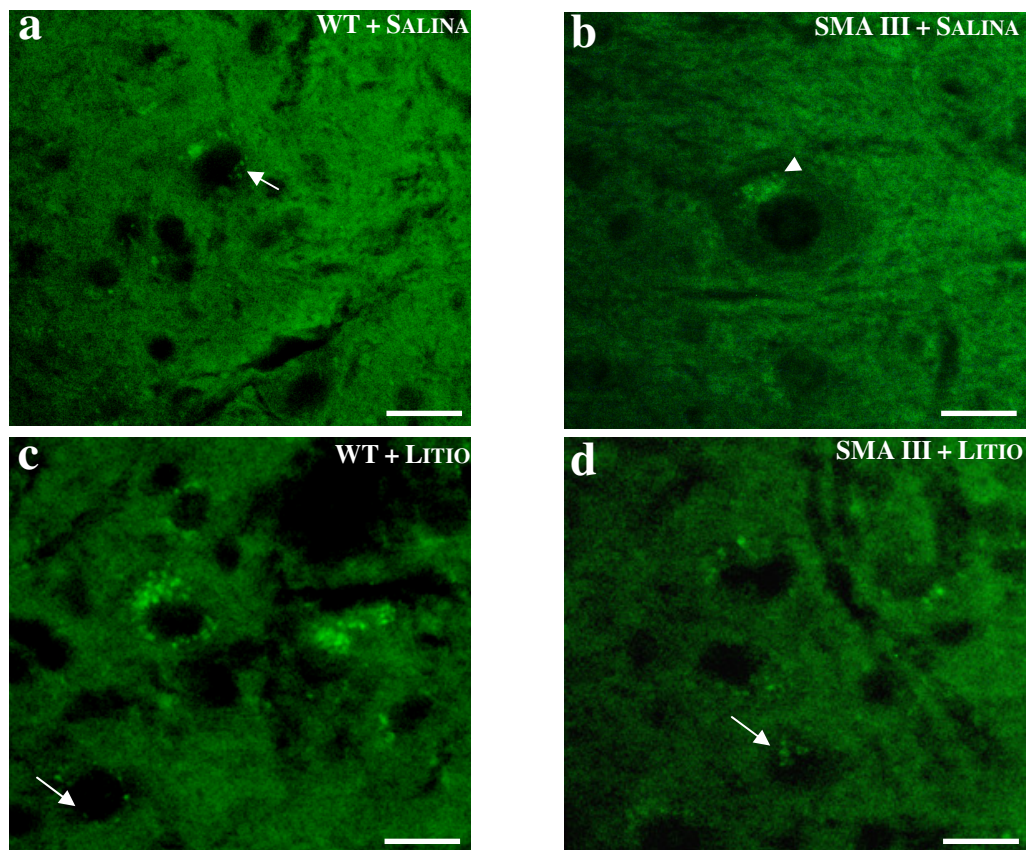


Figura 21 Il trattamento cronico con litio previene l'aggregazione di SMN nei topi SMA III

Immagini rappresentative che mostrano l'immunofluorescenza per la proteina SMN in motoneuroni di topi WT e SMA III trattati con salina (**a** e **b**, rispettivamente) e trattati con litio (**c** e **d**, rispettivamente). Nel topo SMA III trattato con litio (**d**) la marcatura per SMN si appare simile a quella osservata nei topi WT (**a** e **c**), con una diffusa positività nel citoplasma e una marcatura puntiforme a livello nucleare, forse riconducibile ai gems (indicati dalle frecce in a, c, e d). Nei motoneuroni del topo SMA III non trattato (**b**) l'immunopositività per SMN appare concentrata in aggregati citoplasmatici (punta di freccia) e non si rileva a livello nucleare.

Scala: 1cm = 22 μ m

DISCUSSIONE

La SMA è una patologia autosomica recessiva caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni del corno ventrale del midollo spinale. Il gene responsabile della malattia, *SMN1* (Lefebvre et al., 1995), codifica per una proteina coinvolta nella maturazione degli spliceosomi nucleari (Carissimi et al., 2006a,b) e che sembra entrare in gioco nella regolazione dello sviluppo dei prolungamenti nucleari (McWhorter et al., 2003). Tutti i casi di SMA sono determinati da mutazioni del gene *SMN1* che si accompagnano a significative riduzioni nell'espressione di SMN e il decorso e il fenotipo clinico delle varie forme di SMA, appaiono correlati ai livelli di SMN (Lunn and Wang, 2008).

I meccanismi che stanno alla base della degenerazione dei motoneuroni del midollo spinale nella SMA non sono ancora noti, anche se sembrano essere principalmente coinvolte la difettosa formazione di snRNP (Eggert et al., 2006; Pellizzoni, 2007; Gabanella et al., 2007) e/o la alterazione della funzione di SMN a livello degli assoni dei motoneuroni (Fan and Simard, 2002; McWhorter et al., 2003; Rossoll et al., 2003; Eggert et al., 2006; Carrel et al., 2006; Gabanella et al., 2007; Pellizzoni, 2007).

Lo sviluppo di adeguati modelli animali rappresenta un aspetto fondamentale per lo studio dei meccanismi neuropatologici responsabili della degenerazione dei motoneuroni di SMA. Tuttavia, la maggior parte dei modelli animali di SMA presenta una rapida progressione di malattia, che in pochi giorni porta alla paralisi e alla morte dell'animale, non consentendo di indagare in modo dettagliato l'eziopatologia della malattia (Schmid and DiDonato, 2007). Al contrario al fine di caratterizzare il decorso della malattia e i meccanismi che sottostanno ai processi istopatologici che conducono alla perdita dei motoneuroni nella SMA il modello più

idoneo dovrebbe presentare una sintomatologia motoria a decorso lentamente progressivo, che garantisca una significativa sopravvivenza dell'animale per permettere di riconoscere le tappe salienti con cui si realizza la morte neuronale.

A questo scopo, l'attività di ricerca che ho condotto durante il corso di dottorato, si è focalizzata sull'analisi dettagliata di un modello murino transgenico di SMA lieve (tipo III), con genotipo $SMNA2G^{+/-};SMN2^{+/+};Smn^{-/-}$. Il modello è stato prodotto dai laboratori Jackson, attraverso un'accurata selezione di topi mutanti *Smn* e doppi transgenici per i geni umani *SMN2* e *SMN1*, con una mutazione A2G riscontrata in una forma umana di SMA III. Questo modello si differenzia dal modello descritto precedentemente da Monani et al., (2003) solamente per l'espressione del gene *SMN2* che nel caso del modello di Monani è eterozigotica mentre nel modello da me studiato è omozigotica.

Come atteso date le caratteristiche genotipiche riportate, il modello $SMNA2G^{+/-};SMN2^{+/+};Smn^{-/-}$ ha mostrato un decorso di malattia lento, con insorgenza di debolezza muscolare al 215° giorno di età, rivelata attraverso il PaGE test, scomparsa dell'hindlimb extension reflex al 255° giorno di età. Una lenta progressione di malattia è stata descritta anche nel modello di Monani nel quale tuttavia l'insorgenza dei sintomi motori è molto più precoce ed è caratterizzata da riduzione dell'attività motoria e debolezza muscolare, rivelata per mezzo dell'hind limb clasping reflex già a partire da 3 settimane di età. Altre differenze tra i due modelli di SMA lieve riguardano il peso e la crescita corporea. Infatti, il modello transgenico da me studiato non ha mostrato differenze sia nel peso che nelle dimensioni corporee per tutta la durata dell'esperimento rispetto ai corrispondenti littermate mentre nel modello di Monani, si nota una riduzione sia nel peso che nelle dimensioni corporee, pari ad un 20-40%, dalla nascita, fino allo sviluppo e all'età adulta. A tutto ciò si

aggiunge una aspettativa di vita che, mentre nei topi caratterizzati da Monani è di circa 227 giorni, nel modello da me studiato si è protratta per oltre un anno, dato che al momento del sacrificio, fissato al 311° giorno, tutti i topi apparivano ancora in buone condizioni, lasciando presagire che la loro sopravvivenza avrebbe potuto essere ancora più prolungata.

L'indagine morfologica ha dimostrato una riduzione significativa dei motoneuroni a livello delle corna ventrali del midollo spinale in corrispondenza della lamina IX se paragonati ai rispettivi controlli. Questa perdita che ammonta a circa il 50% del totale dei motoneuroni contati nei controlli, risulta più marcata non solo rispetto a quella riscontrata nel modello caratterizzato da Monani (~30%), ma anche rispetto a topi SMA I (35-40%) (Monani et al., 2000), mentre in un modello di SMA III in cui i topi esibivano un genotipo *Smn*^{+/-} Jablonka et al. (2000) hanno evidenziato, come nel nostro modello, una perdita del 50% dei motoneuroni a 12 mesi. Queste differenze nel numero di motoneuroni residui nei vari modelli può dipendere da vari fattori, non ultimi alcuni di tipo metodologico. A questo riguardo, nello studio da me effettuato è stata posta particolare cura nell'esecuzione della conta nel rispetto di un preciso criterio stereologico, che ci ha portato a esaminare un numero considerevole di sezioni per ogni animale, tutte intervallate di 80 µm. Inoltre, l'individuazione dei motoneuroni è avvenuta per mezzo di un criterio di esclusione basato su fattori dimensionali oltre che morfologici e di anatomia microscopica (vedi sezione "Materiali e Metodi"). Nessuno di questi criteri è stato osservato nei lavori sopra riportati e questo può condizionare il risultato finale. Meno importante sembra essere invece la scelta del tratto di midollo in cui sono state effettuate le conte. Infatti, diversamente dalla SLA, l'altra importante patologia degenerativa che colpisce il motoneurone, nella SMA sembra non esserci una insorgenza focale e una successiva

disseminazione della malattia a zone contigue (Ravits et al., 2007). In ogni caso, una riduzione così significativa nel numero di motoneuroni residui presentata dal nostro modello rispetto addirittura a quella riscontrata in modelli di SMA I suggerisce che il numero di motoneuroni possa non essere un fattore determinante nel portare a paralisi e quindi a morte l'animale. Infatti, il modello animale di SMA grave, di tipo I, a fronte di un riduzione di motoneuroni di (35-40%) non riesce a sopravvivere per più di 6 giorni, mentre i modelli di SMA lieve sopravvivono molto più a lungo, fino a un anno o anche più (Monani et al., 2003, Jablonka et al., 2000) pur con una morte motoneuronale del 50%, come rilevato nel nostro studio e confermato da altri autori (Jablonka et al., 2000). Ciò indica che l'entità della perdita dei motoneuroni non è direttamente correlata con sopravvivenza, che invece appare dipendere essenzialmente dalla velocità con cui i motoneuroni degenerano. Dalla nostra analisi risulta inoltre che il diametro dei motoneuroni residui mostra un aumento significativo nei topi SMA rispetto ai corrispondenti littermate. Questo parametro non è stato finora analizzato in nessun altro modello di SMA, mentre presenta una simile alterazione nel topo transgenico G93A, che rappresenta il più comune modello animale di SLA (Fornai et al., 2008a). L'aumento di dimensioni dei motoneuroni misurato dal nostro gruppo di ricerca nei topi G93A conferma osservazioni qualitative effettuate già da altri Autori, che avevano documentato la presenza di motoneuroni abnormemente dilatati (swelled) sia in modelli animali (Gurney et al., 1994) che nei pazienti SLA (Martin et al., 2007). L'indagine al microscopio elettronico ha permesso di considerare questa alterazione morfometrica come una conseguenza dell'estrema vacuolizzazione citosolica dei motoneuroni SLA, dovuta al deficit di autofagia (Fornai et al., 2008a,b; Crippa et al., 2010). Sebbene solo indagini ultrastrutturali possano chiarire la natura della degenerazione dei motoneuroni nella

SMA, dai dati in nostro possesso riteniamo di escludere che l'alterazione morfometrica dei motoneuroni SMA possa dipendere da una alterazione della via autofagica. Infatti, anche se questi motoneuroni tendono ad assumere una forma rotondeggiante, con una drastica perdita della tipica morfologia multipolare, il loro citoplasma non appare vacuolizzato, bensì più diluito rispetto al controllo mentre il nucleo, fatta eccezione per il nucleolo, non è chiaramente distinguibile. Nella SMA di tipo I umana un significativo numero di motoneuroni del midollo spinale vanno a morte per un processo che ha tutte le caratteristiche dell'apoptosi (Galluzzi et al., 2007), in quanto mostra una evidente condensazione del DNA cromosomiale, blebbing della membrana, corpi apoptotici e positività a TUNEL e ISEL (Simic et al., 2000). Se i motoneuroni dei topi SMA del nostro studio vadano incontro o meno a morte apoptotica rimane ancora da definire: analisi immunohistochimiche per tipici marcatori apoptotici come Bax e di microscopia elettronica gold standard per determinare la presenza di apoptosi (Sloviter, 2002) sono in progress per poter descrivere la modalità di morte dei motoneuroni anche nel nostro modello.

Un aspetto interessante della patologia umana, descritto da Simic (2008), è rappresentato dalla continua migrazione da parte di un certo numero di motoneuroni che nel corso dello sviluppo prenatale e ancora dopo la nascita, non si arrestano nel corno ventrale della sostanza grigia del midollo spinale, ma si portano a sconfinare nella sostanza bianca, occupando i cordoni midollari e raggiungendo perfino l'emergenza delle radici ventrali dal midollo spinale. Nell'uomo, in particolare in pazienti affetti da SMA I, questi motoneuroni, chiamati eterotopici, sono stati ritrovati a livello della sostanza bianca ventrale del midollo spinale fino in prossimità della sua superficie e addirittura anche al di fuori del midollo spinale, a livello delle radici ventrali (Simic et al., 2008). Le cause di questo mancato arresto dei

motoneuroni durante la loro migrazione che invece di portarli a raggiungere la loro localizzazione definitiva all'interno della lamina IX del corno ventrale li conduce verso siti eterotopici sono state individuate nella presenza di alterazioni nel loro differenziamento, che riduce i processi dendritici dei motoneuroni, e in una alterazione della formazione di sinapsi, a sua volta aggravata dalla carenza di prolungamenti neuronali, che risulterebbe nel mancato arresto dei motoneuroni migranti. Infatti, almeno la metà di questi motoneuroni eterotopici rimane priva di sinapsi, e una piccola quantità di essi appare in degenerazione di tipo necrotico (Simic et al., 2008). In analogia alla malattia umana, anche nel nostro modello murino di SMA III è stata riscontrata la presenza di motoneuroni eterotopici sia al confine tra la sostanza grigia del corno ventrale e i limitrofi cordoni di sostanza bianca che anche all'interno della sostanza bianca, in stretta vicinanza del corno ventrale. Invece, non sono stati osservati motoneuroni eterotopici più distali, in prossimità della superficie del midollo spinale o nella radice ventrale. Questo può essere spiegato dal fatto che la descrizione morfologica nell'uomo è stata effettuata su reperti autoptici di pazienti affetti da SMA I e II, ed è possibile che queste forme più gravi e aggressive di malattia possano essere accompagnate da processi neuropatologici più accentuati, che esaltano oltre alla rapidità della morte dei motoneuroni anche una maggiore velocità con cui alcuni motoneuroni sfuggono alla loro adeguata localizzazione e si fanno eterotopici. Alla luce di queste considerazioni, è possibile ipotizzare che la presenza di motoneuroni eterotopici possa influenzare la sintomatologia motoria e che quindi rappresenti un parametro determinante per spiegare la perdita di abilità motorie in quei modelli in cui è stata registrata una perdita di motoneuroni non eccessiva.

Infine, l'analisi immunostochimica ha mostrato una diversa distribuzione della proteina SMN in motoneuroni di topi SMA III rispetto ai corrispondenti littermate. In particolare, contrariamente ai topi WT, in cui SMN appare distribuita diffusamente nel citoplasma e in piccola parte anche a livello nucleare sottoforma di piccoli "puncta", in topi SMA III la proteina SMN appare sottoforma di voluminosi aggregati a localizzazione citosolica, mentre non si notano segnali a livello nucleare. In mancanza di una valutazione quantitativa dell'espressione di SMN nel nostro modello, nulla possiamo dire a proposito dei livelli di proteina SMN, che risultano diminuiti nella SMA (Burghes and Beattie, 2009). Tuttavia, la scomparsa nei topi SMA dei puncta nucleari, che osserviamo nei WT e che potrebbero rappresentare i cosiddetti "gems" descritti da vari Autori (Carissimi et al., 2006a), appare in linea con quanto è stato documentato anche in altri modelli murini di SMA (Frugier et al., 2000; Monani et al., 2000; Monani et al., 2003).

Pertanto, in questo studio per la prima volta è stato caratterizzato con dettagliate analisi comportamentali e morfologiche un modello murino di SMA III, che appare promettente per future indagini sui meccanismi patogenetici responsabili della degenerazione motoneuronale nella SMA. La validità generale di questo modello è stata ulteriormente accresciuta dal riscontrare in esso le principali caratteristiche istopatologiche che sono state descritte sulla base dei reperti autoptici provenienti da pazienti SMA.

Nella seconda parte dello studio, i risultati ottenuti nei topi SMA trattati cronicamente con sali di litio offrono degli ulteriori spunti per lo studio dei processi patogenetici alla base della SMA. Le recenti scoperte degli effetti neuroprotettivi del litio nei confronti di malattie neurodegenerative (Chuang et al., 2002), in particolare della SLA (Shin et al., 2007; Feng et al., 2008; Fornai et al., 2008a), ci ha indotto a

sperimentare i potenziali effetti di un trattamento cronico con sali di litio sia sui sintomi che sulle alterazioni istopatologiche descritte nel nostro modello di SMA.

L'analisi comportamentale eseguita a partire dal 60° giorno di età degli animali ci ha permesso di registrare nei topi SMA III trattati con litio un significativo ritardo nella comparsa dei sintomi motori rispetto agli animali SMA III non trattati. Infatti, mentre nei topi SMA III non trattati il PaGE test ha mostrato un significativo calo di forza muscolare a partire dal 215° giorno di età, nei topi SMA III trattati con litio si è registrata una significativa riduzione di forza muscolare a 264 giorni di vita. Invece, l'hind limb extension reflex, è risultato ridotto sia nei topi SMA III non trattati che nei topi SMA III trattati con litio a partire dal 255° giorno. Questi dati forniscono indicazioni chiare di un effetto del trattamento con litio sulla storia di malattia, in quanto ne ritarda l'insorgenza e ne rallenta il decorso. Simili effetti sono stati dimostrati dal nostro gruppo di ricerca nei topi transgenici G93A, modello di SLA, nei quali il trattamento cronico con sali di litio ha prodotto un aumento di $38 \pm 4,3$ giorni della sopravvivenza media, e un prolungamento di $29 \pm 4,3$ giorni della durata media della malattia (Fornai et al., 2008a).

Tali effetti comportamentali sono stati accompagnati da un miglioramento delle principali caratteristiche istopatologiche presenti nel midollo lombare dei topi SMA III trattati con litio.

Infatti, l'analisi della conta stereologica ha evidenziato che il litio ha prodotto una notevole preservazione dei motoneuroni della lamina IX del tratto lombare (numero medio di motoneuroni per sezione: $26,93 \pm 4,64$) rispetto ai topi SMA III non trattati (numero medio di motoneuroni per sezione: $16,47 \pm 1,73$).

Inoltre, il trattamento con litio è stato in grado anche di prevenire l'aumento delle dimensioni (diametro medio: $27,17 \pm 0,6$ nei topi SMA III trattati con litio; :

30,78±1,06 nei topi SMA III non trattati) e l'alterata morfologia dei motoneuroni osservate nei topi SMA III non trattati. In particolare i motoneuroni di topi SMA III trattati con litio riacquistano una tipica morfologia multipolare a livello del corpo cellulare, dove il citoplasma presenta una spiccata basofilia e il nucleo mantiene una propria individualità, apparendo tipicamente chiaro con nucleolo ben evidente.

In aggiunta la somministrazione cronica di sali di litio riduce significativamente, sebbene non prevenga completamente, il numero di motoneuroni eterotopici rispetto a topi SMA III non trattati.

Infine dopo trattamento con litio si osserva anche un ripristino della normale distribuzione della proteina SMN, che torna a marcare diffusamente il citoplasma dei motoneuroni. Inoltre, negli animali SMA III trattati con litio appaiono nuovamente quei puncta fluorescenti all'interno del nucleo (gems), denotando anche per questa via che il litio ha approntato una significativa preservazione dei caratteri morfologici e morfometrici che si osservano in motoneuroni di controllo.

Negli ultimi anni sono stati valutati diversi composti riguardo al loro potenziale effetto neuroprotettivo nella SMA in vivo e in vitro

Nella scelta dei composti da impiegare come possibili strategie terapeutiche nella SMA uno dei principali criteri seguiti è stato quello di individuare quei trattamenti che fossero in grado di indurre un aumento dell'espressione della proteina SMN. In particolare, sia in colture cellulari che in modelli murini di SMA è stata valutata l'efficacia di una serie di sostanze, come l'acido valproico, il fenilbutirato (Andreassi et al., 2004), il sodio butirato (Chang et al., 2001), M344 (Riessland et al., 2006) e SAHA (Riessland et al., 2010), che potenziano la trascrizione genica agendo principalmente come inibitori della istone-deacetilasi. Tra queste, l'acido valproico ha prodotto i migliori risultati. Infatti esperimenti preliminari condotti in colture di

fibroblasti provenienti da pazienti SMA (Brichta et al., 2003) e in modelli murini di SMA III (Tsai et al., 2006; 2008) hanno dimostrato che il trattamento cronico (40-75 mg/kg/giorno) con acido valproico provoca un aumento dell'espressione di SMN rispetto a topi SMA III non trattati e una preservazione del numero di motoneuroni di circa il 55%, sebbene entrambi questi parametri non ripristinino completamente i valori di controllo. Nello stesso modello l'acido valproico ha prodotto un significativo miglioramento dei sintomi motori (Tsai et al., 2008).

Come abbiamo visto, nel nostro studio non è stata eseguita nessuna valutazione quantitativa sull'espressione della proteina SMN. Analisi semiquantitative in western blot sono in progress allo scopo di documentare anche attraverso questo parametro l'effetto protettivo del trattamento con litio nella SMA.

Ancora più recentemente un altro composto, il derivato della 2,4-Diaminoquinazoline D156844 è stato introdotto negli studi sperimentali su topi SMA I nei quali esso produce sia l'aumento dell'espressione della proteina SMN che la preservazione del numero dei motoneuroni rispetto a topi SMA I non trattati (Butchbach et al., 2010). Il meccanismo alla base dell'azione di D156844 consiste nella inibizione dell'enzima scavenger mRNA decapping (DcpS), un elemento della catena di degradazione dell'mRNA, portando al rallentamento della degradazione dell'mRNA con un effetto positivo sulla sintesi di proteine, compresa la proteina SMN (Singh et al., 2008).

In conclusione, la somministrazione cronica di sali di litio, in questo modello animale di SMA III, si è rivelata un promettente intervento farmacologico in quanto ha determinato un significativo effetto protettivo nei topi SMA che consiste in: ritardo nell'insorgenza di sintomi; rallentamento nella progressione della malattia; preservazione del numero, delle dimensioni e dei caratteri morfologici dei

motoneuroni della lamina IX del midollo spinale lombare; riduzione dei motoneuroni eterotopici; ripristino della fisiologica redistribuzione della proteina SMN a livello del corpo cellulare, sia nel citoplasma che nel nucleo. Per quanto è a nostra conoscenza, si tratta del primo potenziale intervento neuroprotettivo la cui efficacia è stata valutata sia attraverso un'accurata analisi comportamentale condotta eseguendo un gran numero di test motori diversi che, soprattutto, attraverso un'attenta analisi degli effetti sull'istopatologia della malattia.

I meccanismi che stanno alla base della neuroprotezione del litio nei confronti dei motoneuroni di topi SMA III non sono ancora chiari. In particolare, sono necessari ulteriori studi al fine di valutare i substrati alla base dell'azione del litio. I dati preliminari in nostro possesso lasciano ritenere che nella SMA la degenerazione dei motoneuroni avvenga per mezzo di un meccanismo diverso dal deficit autofagico dimostrato nella SLA. Pertanto, anche il ruolo neuroprotettivo del litio nella SMA sembra coinvolgere vie diverse dall'attivazione dell'autofagia. D'altra parte, visti i molteplici effetti del litio, che si esplicano attraverso la sua azione su molteplici target (Fornai et al., 2008b; Pasquali et al., 2009), non è da escludere che nel caso della SMA l'azione neuroprotettiva del litio possa passare attraverso altri meccanismi, tra cui l'induzione di fattori di crescita, quali VEGF e BDNF (Fukumoto et al., 2001; Guo et al., 2009; Su et al., 2009), la neuronogenesi (Kim et al., 2004; Su et al., 2007; Fornai et al., 2008a).

BIBLIOGRAFIA

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.* 12(1): 59-65; 2004.

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* 346: 741-742; 1995.

Bretscher A. Fimbrin is a cytoskeletal protein that crosslinks F-actin in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 6849–6853; 1981.

Brichta L, Hofmann Y, Hahnen E, Siebzehnruhl FA, Raschke H, Blumcke I, Eyupoglu IY, Wirth B. Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 12(19): 2481-2489; 2003.

Bromberg MB, Swoboda KJ. Motor unit number estimation in infants and children with spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve* 25: 445-447; 2002.

Brzustowicz LM, Lehner T, Castilla LH, Penchaszadeh GK, Wilhelmsen KC, Daniels R, Davies KE, Leppert M, Ziter F, Wood D, Dubowitz V, Zerres K, Hausmanowa-Petrusewicz I, Ott J, Munsat TL, Gilliam TC. Genetic mapping of chronic childhood-onset spinal muscular atrophy to chromosome 5q11.2-13.3. *Nature* 344(6266): 540-541; 1990.

Brzustowicz LM, Kleyn PW, Boyce FM, Lien LL, Monaco AP, Penchaszadeh GK, Das K, Wang CH, Munsat TL, Ott J, Kunkel LM, Gilliam TC. Fine-mapping of the spinal muscular atrophy locus to a region flanked by MAP1B and D5S6. *Genomics* 13(4): 991-998; 1992.

Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am. J. Hum. Genet.* 61(1): 9-15; 1997.

Burghes HM. Other forms of survival motor neuron protein and spinal muscular atrophy: an opinion. *Neuromuscul. Disord.* 18: 82-83; 2008.

Burghes AH and Beattie CE. Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat. Rev. Neurosci.* 10(8): 597-609; 2009.

Burt EC, Towers PR, Sattelle DB. *Caenorhabditis elegans* in the study of SMN-interacting proteins: a role for SMI-1, an orthologue of human Gemin2 and the identification of novel components of the SMN complex. *Invert. Neurosci.* 6: 145-159; 2006.

Busceti CL, Biagioni F, Aronica E, Rizzo B, Storto M, Battaglia G, Giorgi FS, Gradini R, Fornai F, Caricasole A, Nicoletti F, Bruno V. Induction of the Wnt inhibitor, Dickkopf-1, is associated with neurodegeneration related to temporal lobe epilepsy. *Epilepsia* 48: 694-705; 2007.

Butchbach ME, Singh J, Thorsteinsdóttir M, Saieva L, Slominski E, Thurmond J, Andrésson 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.* 19(3): 454-467; 2010.

Calderó J, Brunet N, Tarabal O, Piedrafita L, Hereu M, Ayala V, Esquerda JE. Lithium prevents excitotoxic cell death of motoneurons in organotypic slice cultures of spinal cord. *Neuroscience* 165(4): 1353-1369; 2010.

Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am. J. Hum. Genet.* 61: 40-50; 1997.

Cappuccio I, Calderone A, Busceti CL, Biagioni F, Pontarelli F, Bruno V, Storto M, Terstappen GT, Gaviraghi G, Fornai F, Battaglia G, Melchiorri D, Zukin RS, Nicoletti F, Caricasole A. Induction of Dickkopf-1, a negative modulator of the Wnt pathway, is required for the development of ischemic neuronal death. *J. Neurosci.* 25: 2647-2657; 2005.

Carissimi C, Baccon J, Straccia M, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pellizzoni L. Unrip is a component of SMN complexes active in snRNP assembly. *FEBS Lett.* 579: 2348–2354; 2005.

Carissimi C, Saieva L, Baccon J, Chiarella P, Maiolica A, Sawyer A, Rappsilber J, Pellizzoni L. Gemin8 is a novel component of the survival motor neuron complex and functions in snRNP assembly. *J. Biol. Chem.* 281: 8126–8134; 2006a.

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.* 281: 37009–37016; 2006b.

Carrel TL, McWhorter ML, Workman E, Zhang H, Wolstencroft EC, Lorson C, Bassell GJ, Burghes AH, Beattie CE. Survival motor neuron function in motor axons is independent of functions required for small nuclear ribonucleoprotein biogenesis. *J. Neurosci.* 26(43): 11014-11022; 2006.

Cartegni L and Krainer AR. Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat. Genet.* 30(4): 377-384; 2002.

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.* 78(1): 63-77; 2006.

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.* 147(4): 715-728; 1999.

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 motorneuron gene mutant. *Hum. Mol. Genet.* 12(12): 1367-1376; 2003.

Chang HC, Hung WC, Chuang YJ, Jong YJ. Degradation of survival motor neuron (SMN) protein is mediated via the ubiquitin/proteasome pathway. *Neurochem. Int.* 45(7): 1107-12; 2004.

Chang JG, Hsieh-Li HM, Jong YJ, Wang NM, Tsai CH, Li H. Treatment of spinal muscular atrophy by sodium butyrate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98(17): 9808-9813; 2001.

Cheng D, Cote J, Shaaban S, Bedford MT. The arginine methyltransferase CARM1 regulates the coupling of transcription and mRNA processing. *Mol. Cell.* 25: 71-83; 2007.

Chuang DM, Chen RW, Chalecka-Franaszek E, Ren M, Hashimoto R, Senatorov V, Kanai H, Hough C, Hiroi T, Leeds P. Neuroprotective effects of lithium in cultured cells and animal models of diseases. *Bipolar. Disord.* 4: 129-136; 2002.

Claus P, Bruns AF, Grothe C. Fibroblast growth factor-2(23) binds directly to the survival of motoneuron protein and is associated with small nuclear RNAs. *Biochem. J.* 384: 559-565; 2004.

Clermont O, Burlet P, Burglen L, Lefebvre S, Pascal F, McPherson J, Wasmuth JJ, Cohen D, Le Paslier D, Weissenbach J, Lathrop M, Munnich A, Melki J. Use of genetic and physical mapping to locate the spinal muscular atrophy locus between two new highly polymorphic DNA markers. *Am. J. Hum. Genet.* 54(4): 687-694; 1994.

Clermont, O., Burlet, P., Lefebvre, S., Burglen, L., Munnich, A., Melki, J. SMN gene deletions in adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 346: 1712-1713; 1995.

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.* 6(8): 1205-1214; 1997.

Criollo A, Maiuri MC, Tasdemir E, Vitale I, Fiebig AA, Andrews D, Molgó J, Díaz J, Lavandero S, Harper F, Pierron G, di Stefano D, Rizzuto R, Szabadkai G, Kroemer G. Regulation of autophagy by the inositol trisphosphate receptor. *Cell. Death Differ.* 14(5): 1029-1039; 2007.

Crippa V, Sau D, Rusmini P, Boncoraglio A, Onesto E, Bolzoni E, Galbiati M, Fontana E, Marino M, Carra S, Bendotti C, De Biasi S, Poletti A. The small heat shock protein B8 (HspB8) promotes autophagic removal of misfolded proteins involved in amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Hum. Mol. Genet.* 19(17): 3440-3456; 2010.

Culetto E and Sattelle DB. A role for *Caenorhabditis elegans* in understanding the function and interactions of human disease genes. *Hum. Mol. Genet.* 9: 869-877; 2000.

DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH, Simard LR. Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neuron gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* 7: 339-352; 1997.

Dubowitz V. Very severe spinal muscular atrophy (SMA type 0): an expanding clinical phenotype. *Eur. J. Paediatr. Neurol.* 3(2): 49-51; 1999.

Eggert C, Chari A, Laggerbauer B, Fischer U. Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol. Med.* 12: 113-121; 2006.

Fan L and Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum. Mol. Genet.* 11(14): 1605-1614; 2002.

Feldkotter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, 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. *Am. J. Hum. Genet.* 70: 358-368; 2002.

Feng HL, Leng Y, Ma CH, Zhang J, Ren M, Chuang DM. Combined lithium and valproate treatment delays disease onset, reduces neurological deficits and prolongs survival in an amyotrophic lateral sclerosis mouse model. *Neuroscience* 155: 567–572; 2008.

Ferrucci M, Spalloni A, Bartalucci A, Cantafora E, Fulceri F, Nutini M, Longone P, Paparelli A, Fornai F. A systematic study of brainstem motor nuclei in a mouse model of ALS, the effects of lithium. *Neurobiol. Dis.* 37(2): 370-383; 2010.

Fornai F, Longone P, Cafaro L, Kastsuchenka O, Ferrucci M, Manca ML, Lazzeri G, Spalloni A, Bellio N, Lenzi P, Modugno N, Siciliano G, Isidoro C, Murri L, Ruggieri S, Paparelli A. Lithium delays progression of amyotrophic lateral sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105(6): 2052-2057; 2008a.

Fornai F, Longone P, Ferrucci M, Lenzi P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A. Autophagy and amyotrophic lateral sclerosis: The multiple roles of lithium. *Autophagy* 4(4): 527-530; 2008b.

Frugier T, Tiziano FD, 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. *Hum. Mol. Genet.* 9(5): 849-858; 2000.

Frugier T, Nicole S, Cifuentes-Diaz C, Melki J. The molecular bases of spinal muscular atrophy. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 12: 294-298; 2002.

Fukumoto T, Morinobu S, Okamoto Y, Kagaya A, Yamawaki S. Chronic lithium treatment increases the expression of brain-derived neurotrophic factor in the rat brain. *Psychopharmacology (Berl)*. 158(1): 100-106; 2001.

Fulceri F, Ferrucci M, Lazzeri G, Paparelli S, Bartalucci A, Tamburini I, Paparelli A, Fornai F. Autophagy activation in glutamate-induced motor neuron loss. *Arch. Ital. Biol.* 149(1): 101-111; 2011.

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.* 14: 3629-3642; 2005.

Gabanella F, Butchbach ME, Saieva L, Carissimi C, Burghes AH, Pellizzoni L. Ribonucleoprotein assembly defects correlate with spinal muscular atrophy severity and preferentially affect a subset of spliceosomal snRNPs. *PLoS One*. 2(9): e921; 2007.

Galluzzi L, Maiuri MC, Vitale I, Zischka H, Castedo M, Zitvogel L, Kroemer G. Cell death modalities: classification and pathophysiological implications. *Cell Death Differ.* 14(7): 1237-1243; 2007.

Galtrey CM, Asher RA, Nothias F, Fawcett JW. Promoting plasticity in the spinal cord with chondroitinase improves functional recovery after peripheral nerve repair. *Brain* 130: 926-939; 2007.

Gavrilov DK, Shi X, Das K, Gilliam TC, Wang CH. Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat. Genet.* 20(3): 230-231; 1998.

Glenney JR Jr, Kaulfus P, Matsudaira P, Weber K. F-actin binding and bundling properties of fimbrin, a major cytoskeletal protein of microvillus core filaments. *J. Biol. Chem.* 256: 9283-9288; 1981.

Grimmler M, Otter S, Peter C, Muller F, Chari A, Fischer U. Unrip, a factor implicated in cap-independent translation, associates with the cytosolic SMN

complex and influences its intracellular localization. *Hum. Mol. Genet.* 14: 3099–3111; 2005a.

Grimmler M, Bauer L, Nousiainen M, Körner R, Meister G, Fischer U. Phosphorylation regulates the activity of the SMN complex during assembly of spliceosomal U snRNPs. *EMBO Rep.*6(1): 70-76; 2005b.

Guo S, Arai K, Stins MF, Chuang DM, Lo EH. Lithium upregulates vascular endothelial growth factor in brain endothelial cells and astrocytes. *Stroke* 40(2): 652-655; 2009.

Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al. Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation. *Science* 264(5166): 1772-1775; 1994.

Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schöneborn S, Schönling J, Zerres K, Wirth B. Molecular analysis of candidate genes on chromosome 5q13 in autosomal recessive spinal muscular atrophy: evidence of homozygous deletions of the SMN gene in unaffected individuals. *Hum. Mol. Genet.*4(10): 1927-1933; 1995.

Hebert MD, Shpargel KB, Ospina JK, Tucker KE, Matera AG. Coilin methylation regulates nuclear body formation. *Dev. Cell* 3: 329-337; 2002.

Hoffmann J. Ueber Chronische spinale Muskelatrophie im Kindesalter, auf familiärer Basis. *Deutsch Z Nervenheilk* 3: 427-470; 1893.

Hoffmann J. Über die hereditäre progressive spinale muskeltrophie in kindesalter. *Muenchen Med. Wschr.* 47: 1649–1651; 1900.

Hofmann Y and Wirth B. hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum. Mol. Genet.* 11: 2037-2049; 2002.

Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B. Htra2-beta 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 9618-9623; 2000.

Hsieh-Li HM, Chang JG, Jong YJ, Wu MH, Wang NM, Tsai CH, Li H. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 24(1): 66-70; 2000.

Jablonka S, Schrank B, Kralewski M, Rossoll W, Sendtner M. Reduced survival motor neuron (Smn) gene dose in mice leads to motor neuron degeneration: an animal model for spinal muscular atrophy type III. *Hum. Mol. Genet.* 9: 341-346; 2000.

Jablonka S, Wiese S, Sendtner M. Axonal defects in mouse models of motoneuron disease. *J. Neurobiol.* 58: 272-286; 2004.

Jablonka S, Beck M, Lechner BD, Mayer C, Sendtner M. Defective Ca²⁺ channel clustering in axon terminals disturbs excitability in motoneurons in spinal muscular atrophy. *J. Cell. Biol.* 179: 139-149; 2007.

Jones KW, Gorzynski K, Hales CM, Fischer U, Badbanchi F, Terns RM, Terns MP. Direct interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the small nucleolar RNA-associated protein fibrillarin. *J. Biol. Chem.* 276(42): 38645-38651; 2001.

Kashima T and Manley JL. A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat. Genet.* 34(4): 460-463; 2003.

Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL. hnRNP A1 functions with specificity in repression of SMN2 exon 7 splicing. *Hum. Mol. Genet.* 16(24): 3149-3159; 2007a.

Kashima T, Rao N, Manley JL. An intronic element contributes to splicing repression in spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(9): 3426-3431; 2007b.

Kim JS, Chang MY, Yu IT, Kim JH, Lee SH, Lee YS, Son H. Lithium selectively increases neuronal differentiation of hippocampal neural progenitor cells both in vitro and in vivo. *J. Neurochem.* 89(2): 324-336; 2004.

Kugelberg E, Welander L. Heredofamilial juvenile muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *AMA Arch. Neurol. Psychiatry* 75(5): 500-509; 1956.

La Spada AR. Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. 1999 Feb 26 [updated 2006 Dec 28]. In: Pagon RA, Bird TD, Dolan CR, Stephens K, editors. GeneReviews [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-.

Le TT, Pham LT, Butchbach ME, Zhang HL, Monani UR, Coovert DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AH. SMN Δ 7, 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. *Hum. Mol. Genet.* 14(6): 845-857; 2005.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80(1): 155-165; 1995.

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.* 16(3): 265-269; 1997.

Lim SR and Hertel KJ. Modulation of survival motor neuron pre-mRNA splicing by inhibition of alternative 3' splice site pairing. *J. Biol. Chem.* 276: 45476-45483; 2001.

Liu Q and Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *Embo J.* 15: 3555-3565; 1996.

Lorson CL and Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum. Mol. Genet.* 9(2): 259-265; 2000.

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.* 19: 63–66; 1998.

Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B. A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96(11): 6307-6311; 1999.

Lunn MR, Wang CH. Spinal muscular atrophy. *Lancet* 371(9630): 2120-2133; 2008.
Manji HK and Lenox RH. Lithium: a molecular transducer of mood-stabilization in the treatment of bipolar disorder. *Neuropsychopharmacol.* 19: 161-166; 1998.

Markowitz JA, Tinkle MB, Fischbeck KH. Spinal muscular atrophy in the neonate. *J. Obstet. Gynecol. Neonatal. Nurs.* 33(1): 12-20; 2004.

Martin LJ. Transgenic mice with human mutant genes causing Parkinson's disease and amyotrophic lateral sclerosis provide common insight into mechanisms of motor neuron selective vulnerability to degeneration. *Rev. Neurosci.* 18(2): 115-136; 2007.

Matera AG, Terns RM, Terns MP. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 8: 209–220; 2007.

McAndrew, PE, Parsons DW, Simard LR, Rochette C, Ray P, Mendell JR, Prior TW, Burghes AHM. Identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients by analysis of SMNT and SMNC copy number. *Am. J. Hum. Genet.* 60: 1411–1422; 1997.

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.* 162(5): 919-931; 2003.

Meister G and Fischer U. Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *Embo J.* 21: 5853-5863; 2002.

Meister G, Bühler D, Laggerbauer 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.* 9(13): 1977-1986; 2000.

Meister G, Buhler D, Pillai R, Lottspeich F, Fischer U. A multiprotein complex mediates the ATP-dependent assembly of spliceosomal U snRNPs. *Nat. Cell. Biol.* 3: 945-949; 2001.

Meister G, Eggert C, Fischer U SMN-mediated assembly of RNPs: a complex story. *Trends Cell Biol.* 12: 472-478; 2002.

Melki J, Abdelhak S, Sheth P, Bachelot MF, Burlet P, Marcadet A, Aicardi J, Barois A, Carriere JP, Fardeau M, Fontan D, Ponsot G, Billette T, Angelini C, Barbosa C, Ferriere G, Lanzi G, Ottolini A, Babron MC, Cohen D, Hanauer A, Clerget-Darpoux F, Lathrop M, Munnich A, Frezal J. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature* 344(6268): 767-768; 1990.

Melki J, Lefebvre S, Burglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Bénichou B, Zeviani M, Le Paslier D, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A. De novo and inherited deletions of the 5q13 region in spinal muscular atrophies. *Science* 264(5164): 1474-1477; 1994.

Miguel-Aliaga I, Culetto E, Walker DS, Baylis HA, Sattelle DB, Davies KE. The *Caenorhabditis elegans* orthologue of the human gene responsible for spinal muscular atrophy is a maternal product critical for germline maturation and embryonic viability. *Hum. Mol. Genet.* 8(12): 2133-2143; 1999.

Miguel-Aliaga I, Chan YB, Davies KE, van den Heuvel M. Disruption of SMN function by ectopic expression of the human SMN gene in *Drosophila*. *FEBS Lett.* 486: 99-102; 2000.

Miller JR. The Wnts. *Genome Biol.* 3(1): REVIEWS3001; 2002.

Miller JR, Hocking AM, Brown JD, Moon RT: Mechanism and function of signal transduction by the Wnt/beta-catenin and Wnt/Ca²⁺ pathways. *Oncogene* 18: 7860-7872; 1999.

Monani UR. Spinal muscular atrophy: a deficiency in a ubiquitous protein; a motor neuron specific disease. *Neuron* 48: 885–895; 2005.

Monani UR, Sendtner M, Coover DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossoll W, Prior TW, Morris GE, Burghes AH. The human centromeric survival motor neuron gene (SMN2) rescues embryonic lethality in *Smn(-/-)* mice and results in a mouse with spinal muscular atrophy. *Hum. Mol. Genet.* 9(3): 333-339; 2000.

Monani UR, Pastore MT, Gavriline TO, Jablonka S, Le TT, Andreassi C, DiCocco JM, Lorson C, Androphy EJ, Sendtner M, Podell M, Burghes AH. A transgene carrying an A2G missense mutation in the SMN gene modulates phenotypic severity in mice with severe (type I) spinal muscular atrophy. *J. Cell. Biol.* 160(1): 41-52; 2003.

Mouaikel J, Narayanan U, Verheggen C, Matera AG, Bertrand E, Tazi J, Bordonne R. Interaction between the small-nuclear-RNA cap hypermethylase and the spinal muscular atrophy protein, survival of motor neuron. *EMBO Rep.* 4: 616–622; 2003.

Mourelatos Z, Abel L, Yong J, Kataoka N, Dreyfuss G. SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *Embo J.* 20: 5443–5452; 2001.

Mourelatos Z, Dostie J, Paushkin S, Sharma A, Charroux B, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* 16: 720–728; 2002.

Munsat TL. International SMA Collaboration. *Neuromuscul. Disord.* 1: 81; 1991.

Narayanan U, Achsel T, Luhrmann R, Matera AG. Coupled *in vitro* import of U snRNPs and SMN, the spinal muscular atrophy protein. *Mol. Cell.* 16: 223–234; 2004.

Nasevicius A and Ekker SC. Effective targeted gene ‘knockdown’ in zebrafish. *Nat. Genet.* 26: 216-220; 2000.

Oprea GE, Kröber S, McWhorter ML, Rossoll W, Müller S, Krawczak M, Bassell GJ, Beattie CE, Wirth B. Plastin 3 is a protective modifier of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Science* 320(5875): 524-527; 2008.

Otter S, Grimmler M, Neuenkirchen N, Chari A, Sickmann A, Fischer U. A comprehensive interaction map of the human SMN–complex. *J. Biol. Chem.* 282: 5825–5833; 2007.

Paoletti R, Nicosia S, Clementi F, Fumagalli G. Farmacologia generale e molecolare. *UTET*; 1996.

Pasquali L, Longone P, Isidoro C, Ruggieri S, Paparelli A, Fornai F. Autophagy, lithium, and amyotrophic lateral sclerosis. *Muscle Nerve* 40(2): 173-194; 2009.

Paushkin S, Charroux B, Abel L, Perkinson RA, Pellizzoni L, Dreyfuss G. The survival motor neuron protein of *Schizosacharomyces pombe*. Conservation of survival motor neuron interaction domains in divergent organisms. *J. Biol. Chem.* 275(31): 23841-23846; 2000.

Paushkin S, Gubitz AK, Massenet S, Dreyfuss G. The SMN complex, an assemblysome of ribonucleoproteins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 14: 305–312; 2002.

Pearn J. The gene frequency of acute Werdnig–Hoffmann disease (SMA type 1). A total population survey in North-East England. *J. Med. Genet.* 10: 260–265; 1973.

Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J. Med. Genet.* 15: 409–413; 1978.

Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding to snRNP proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 11167–11172; 1999.

Pellizzoni L, Charroux B, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. A functional interaction between the survival motor neuron complex and RNA polymerase II. *J. Cell. Biol.* 152: 75–85; 2001.

Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science* 298: 1775–1779; 2002.

Pellizzoni L. Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep.* 8(4): 340–355; 2007.

Piazzon N, Rage F, Schlotter F, Moine H, Branlant C, Massenet S. In vitro and in cellulo evidences for association of the survival of motor neuron complex with the fragile X mental retardation protein. *J. Biol. Chem.* 283: 5598–5610; 2008.

Rajendra TK, Gonsalvez GB, Walker MP, Shpargel KB, Salz HK, Matera AG. A *Drosophila melanogaster* model of spinal muscular atrophy reveals a function for SMN in striated muscle. *J. Cell. Bio.* 176: 831–841; 2007.

Ravits J, Paul P, Jorg C. Focality of upper and lower motor neuron degeneration at the clinical onset of ALS. *Neurology* 68(19): 1571–1575; 2007.

Riessland M, Brichta L, Hahnen E, Wirth B. The benzamide M344, a novel histone deacetylase inhibitor, significantly increases SMN2 RNA/protein levels in spinal muscular atrophy cells. *Hum Genet.* 120(1): 101-110; 2006.

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.* 19(8):1492-1506; 2010.

Roberts DF, Chavez J, Court SDM. The genetic component in child mortality. *Arch. Dis. Child.* 45: 33–38; 1970.

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.* 108(3): 255-266; 2001.

Rosen OR., Siddique T, Panerson O, Figiewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donalsson D, Goto J, O'Regan JP, Deng H-X, Rahmani Z, Krizus A, McKenna-Yasek D, Cayabyab A, Gaston AM, Berger R, Tanzi RE, Halperin JJ, Harzfeldt B, Van den Bergh R, Hung WY, Bird T, Deng G, Mulder DW, Smyth C, Laing NG, Soriano E, Pericak-Vance MA, Haines J, Rouleau GA, Gusella JS, Horvitz HR, Brown RH Jr. Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature* 362: 59-62; 1993.

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.* 11: 93–105; 2002.

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.* 163(4): 801-812; 2003.

Russman BS. Spinal muscular atrophy: clinical classification and disease heterogeneity. *J. Child. Neurol.* 22(8): 946-951; 2007.

Ryves WJ and Harwood AJ. Lithium inhibits glycogen synthase kinase-3 by competition for magnesium. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 280: 720-725; 2001.

Sarkar S and Rubinsztein DC. Inositol and IP3 levels regulate autophagy: biology and therapeutic speculations. *Autophagy* 2: 132-134; 2006.

Sarkar S, Krishna G, Imarisio S, Saiki S, O'Kane CJ, Rubinsztein DC. A rational mechanism for combination treatment of Huntington's disease using lithium and rapamycin. *Hum. Mol. Genet.* 17(2): 170-178; 2008.

Schmid A and DiDonato CJ. Animal Models of Spinal Muscular Atrophy. *J. Child. Neurol.* 22: 1004-1012; 2007.

Schmutz J, Martin J, Terry A, Couronne O, Grimwood J, Lowry S, Gordon LA, Scott D, Xie G, Huang W, Hellsten U, Tran-Gyamfi M, She X, Prabhakar S, Aerts A, Altherr M, Bajorek E, Black S, Branscomb E, Caoile C, Challacombe JF, Chan YM, Denys M, Detter JC, Escobar J, Flowers D, Fotopulos D, Glavina T, Gomez M, Gonzales E, Goodstein D, Grigoriev I, Groza M, Hammon N, Hawkins T, Haydu L, Israni S, Jett J, Kadner K, Kimball H, Kobayashi A, Lopez F, Lou Y, Martinez D, Medina C, Morgan J, Nandkeshwar R, Noonan JP, Pitluck S, Pollard M, Predki P, Priest J, Ramirez L, Retterer J, Rodriguez A, Rogers S, Salamov A, Salazar A, Thayer N, Tice H, Tsai M, Ustaszewska A, Vo N, Wheeler J, Wu K, Yang J, Dickson M, Cheng JF, Eichler EE, Olsen A, Pennacchio LA, Rokhsar DS, Richardson P, Lucas SM, Myers RM, Rubin EM. The DNA sequence and comparative analysis of human chromosome 5. *Nature* 431(7006): 268-274; 2004.

Schrank B, Götz R, Gunnensen JM, Ure JM, Toyka KV, Smith AG, Sendtner M. Inactivation of the survival motor neuron gene, a candidate gene for human spinal muscular atrophy, leads to massive cell death in early mouse embryos. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(18): 9920-9925; 1997.

Seelan RS, Parthasarathy LK, Parthasarathy RN. Lithium modulation of the human inositol monophosphatase 2 (IMPA2) promoter. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324(4): 1370-1378; 2004.

Setola V, Terao M, Locatelli D, Bassanini S, Garattini E, Battaglia G. Axonal-SMN (α -SMN), a protein isoform of the survival motor neuron gene, is specifically involved in axonogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104(6): 1959-1964; 2007.

Sharma A, Lambrechts A, Hao le T, Le TT, Sewry CA, Ampe C, Burghes AH, Morris GE. A role for complexes of survival of motor neurons (SMN) protein with gemins and profilin in neurite-like cytoplasmic extensions of cultured nerve cells. *Exp. Cell. Res.* 309: 185–197; 2005.

Shin JH, Cho SI, Lim HR, Lee JK, Lee YA, Noh JS, Joo IS, Kim KW, Gwag BJ. Concurrent administration of Neu2000 and lithium produces marked improvement of motor neuron survival, motor function, and mortality in a mouse model of amyotrophic lateral sclerosis. *Mol. Pharmacol.* 71: 965-975; 2007.

Shpargel KB and Matera AG. Gemin proteins are required for efficient assembly of Sm-class ribonucleoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 17372–17377; 2005.

Simic G. Pathogenesis of proximal autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol.* 116(3): 223-234; 2008.

Simic G, Seso-Simic D, Lucassen PJ, Islam A, Krsnik Z, Cviko A, Jelasic D, Barisic N, Winblad B, Kostovic I, Kruslin B. Ultrastructural analysis and TUNEL demonstrate motor neuron apoptosis in Werdnig-Hoffmann disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59(5): 398-407; 2000.

Simic G, Mladinov M, Seso Simic D, Jovanov Milosevic N, Islam A, Pajtak A, Barisic N, Sertic J, Lucassen PJ, Hof PR, Kruslin B. Abnormal motoneuron migration, differentiation, and axon outgrowth in spinal muscular atrophy. *Acta Neuropathol.* 115(3): 313-326; 2008.

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.* 26: 1333-1346; 2006.

Singh J, Salcius M, Liu SW, Staker BL, Mishra R, Thurmond J, Michaud G, Mattoon DR, Printen J, Christensen J, Bjornsson JM, Pollok BA, Kiledjian M, Stewart L, Jarecki J, Gurney ME. DcpS as a therapeutic target for spinal muscular atrophy. *ACS Chem. Biol.* 3(11): 711-722; 2008.

Sloviter RS. Apoptosis: a guide for the perplexed. *Trends Pharmacol. Sci.* 23(1): 19-24; 2002.

Su H, Chu TH, Wu W. Lithium enhances proliferation and neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the adult rat spinal cord. *Exp. Neurol.* 206(2): 296-307; 2007.

Su H, Zhang W, Guo J, Guo A, Yuan Q, Wu W. Lithium enhances the neuronal differentiation of neural progenitor cells in vitro and after transplantation into the avulsed ventral horn of adult rats through the secretion of brain-derived neurotrophic factor. *J. Neurochem.* 108(6): 1385-1398; 2009.

Sulston JE, Schierenberg E, White JG, Thomson JN. The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev. Bio.* 100: 64-119; 1983.

Talbot K, Ponting CP, Theodosiou AM, Rodrigues NR, Surtees R, Mountford R, Davies KE. Missense mutation clustering in the survival motor neuron gene: a role for a conserved tyrosine and glycine rich region of the protein in RNA metabolism? *Hum. Mol. Genet.* 6(3): 497-500; 1997.

Vitte J, Fassier C, Tiziano FD, Dalard C, Soave S, Roblot N, Brahe C, Saugier-veber P, Bonnefont JP, Melki J. Refined characterization of the expression and stability of the SMN gene products. *Am. J. Pathol.* 171(4): 1269-1280; 2007.

Wan L, Battle DJ, Yong J, Gubitzi AK, Kolb SJ, Wang J, Dreyfuss G. The survival of motor neurons protein determines the capacity for snRNP assembly: biochemical deficiency in spinal muscular atrophy. *Mol. Cell. Biol.* 25: 5543–5551; 2005.

Wang CH, Kleyn PW, Vitale E, Ross BM, Lien L, Xu J, Carter TA, Brzustowicz LM, Obici S, Selig S, Pavone L, Parano E, Penchaszadeh GK, Munsat T, Kunkel LM, Gilliam TC. Refinement of the spinal muscular atrophy locus by genetic and physical mapping. *Am. J. Hum. Genet.* 56(1): 202-209; 1995.

Wang CH, Finkel RS, Bertini ES, Schroth M, Simonds A, Wong B, Aloysius A, Morrison L, Main M, Crawford TO, Trela A; Participants of the International Conference on SMA Standard of Care. Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J. Child. Neurol.* 22(8): 1027-1049; 2007.

Watson C, Paxinos G, Kayalioglu G (eds). (2009) *The Spinal Cord. A Christopher and Dana Reeve Foundation Text and Atlas.* Elsevier Academic Press. San Diego. ISBN: 978-012374

Werdnig G. Zwei fruhinfantile ereditare Falle von progressiver Muskelatrophie unter dem Bilde der Dystrophie, aber auf neurotischer Grundlage. *Arch. Psychiat. Nervenkr.* 22: 437–480; 1891.

Werdnig G. Die fruhinfantile progressive spinale amyotrophie. *Arch. Psychiat.* 26: 706–744; 1894.

Werdnig G. Two early infantile hereditary cases of progressive muscular atrophy simulating dystrophy, but on a neural basis. 1891. *Arch. Neurol.* 25(3): 276-278; 1971.

Will CL and Luhrmann R. Spliceosomal UsnRNP biogenesis, structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13: 290–301; 2001.

Wirth B, Brichta L, Hahnen E. Spinal Muscular Atrophy: From Gene to Therapy. *Semin. Pediatr. Neurol.* 13: 121-131; 2006.

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.* 265(2): 252-261; 2001.

Young PJ, DiDonato CJ, Hu D, Kothary R, Androphy EJ, Lorson CL. SRp30c-dependent stimulation of survival motor neuron (SMN) exon 7 inclusion is facilitated by a direct interaction with hTra2 beta 1. *Hum. Mol. Genet.* 11: 577-587; 2002.

Zerres, K., Rudnik-Schoneborn, S., Forkert, R., Wirth, B. Genetic basis of adult-onset spinal muscular atrophy. *Lancet* 346: 1162-only; 1995.

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.* 26(33): 8622-8632; 2006.

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.* 23(16): 6627-6637; 2003.

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* 133(4): 585-600; 2008.