



„Forschung und Therapie bei SMA“

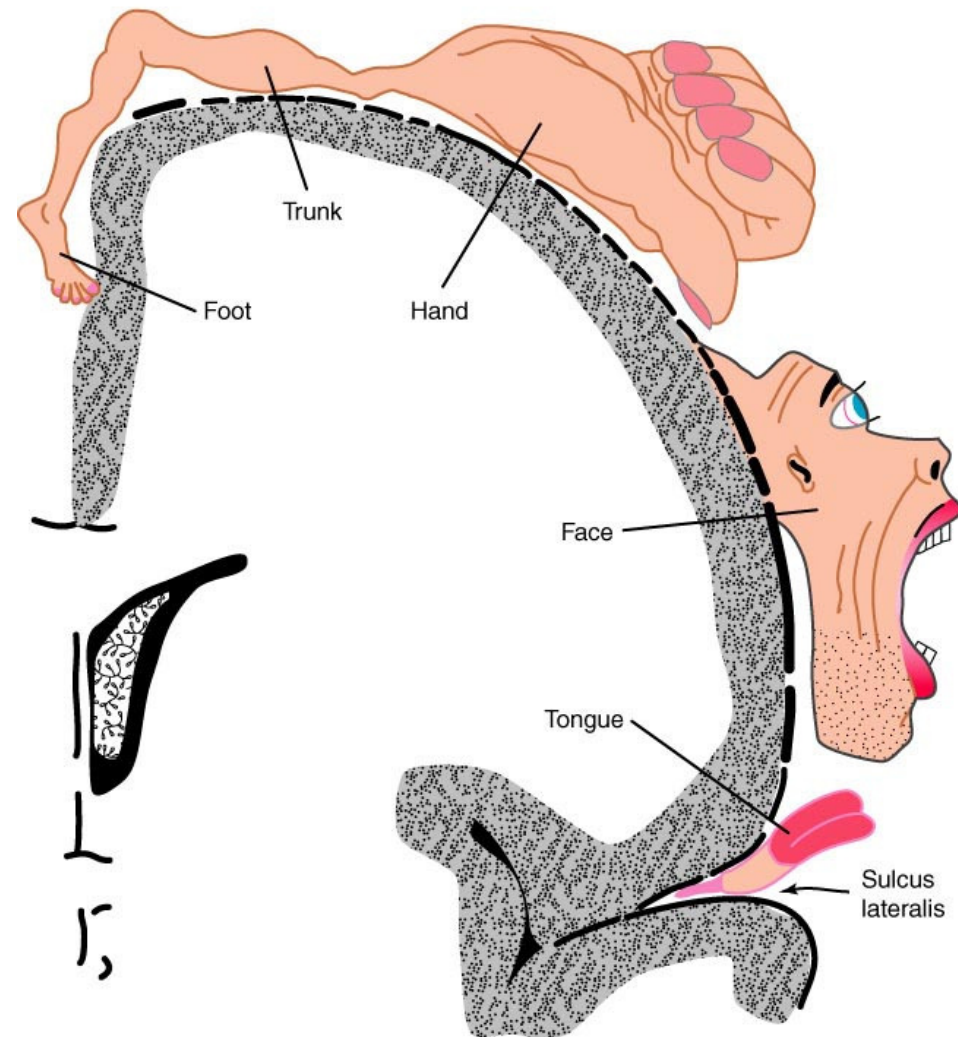
Sibylle Jablonka
Institut für klinische Neurobiologie, Würzburg

Anatomie des Motorischen Nervensystems I:

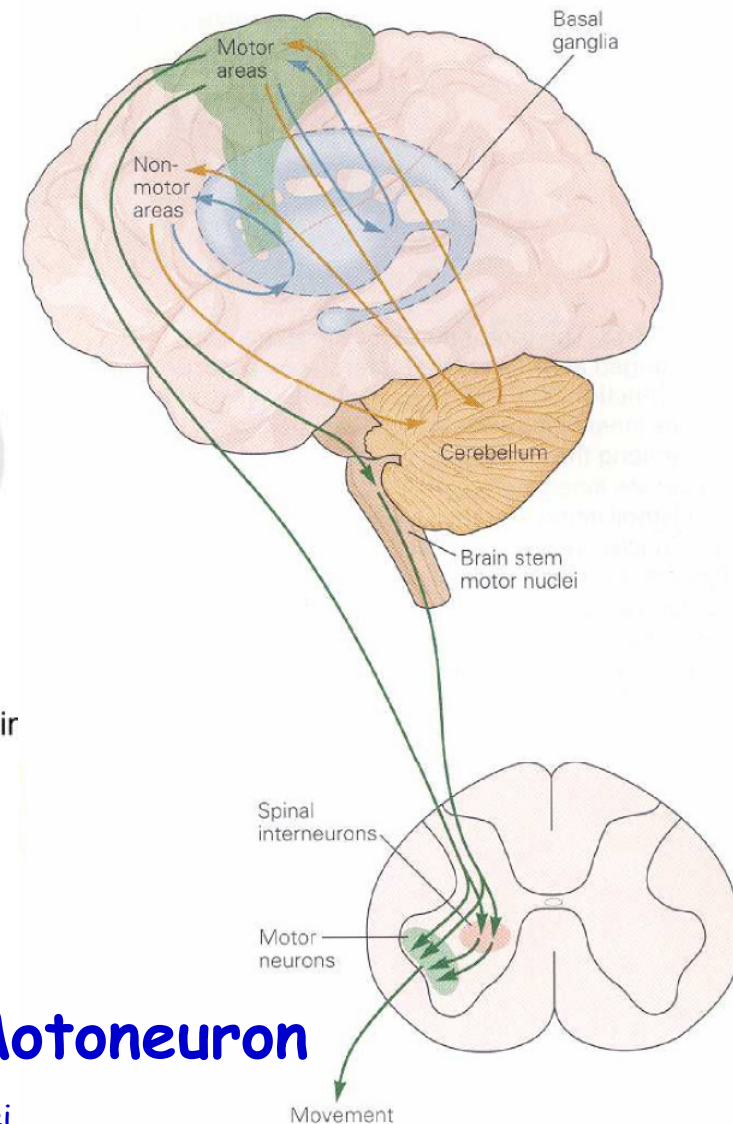
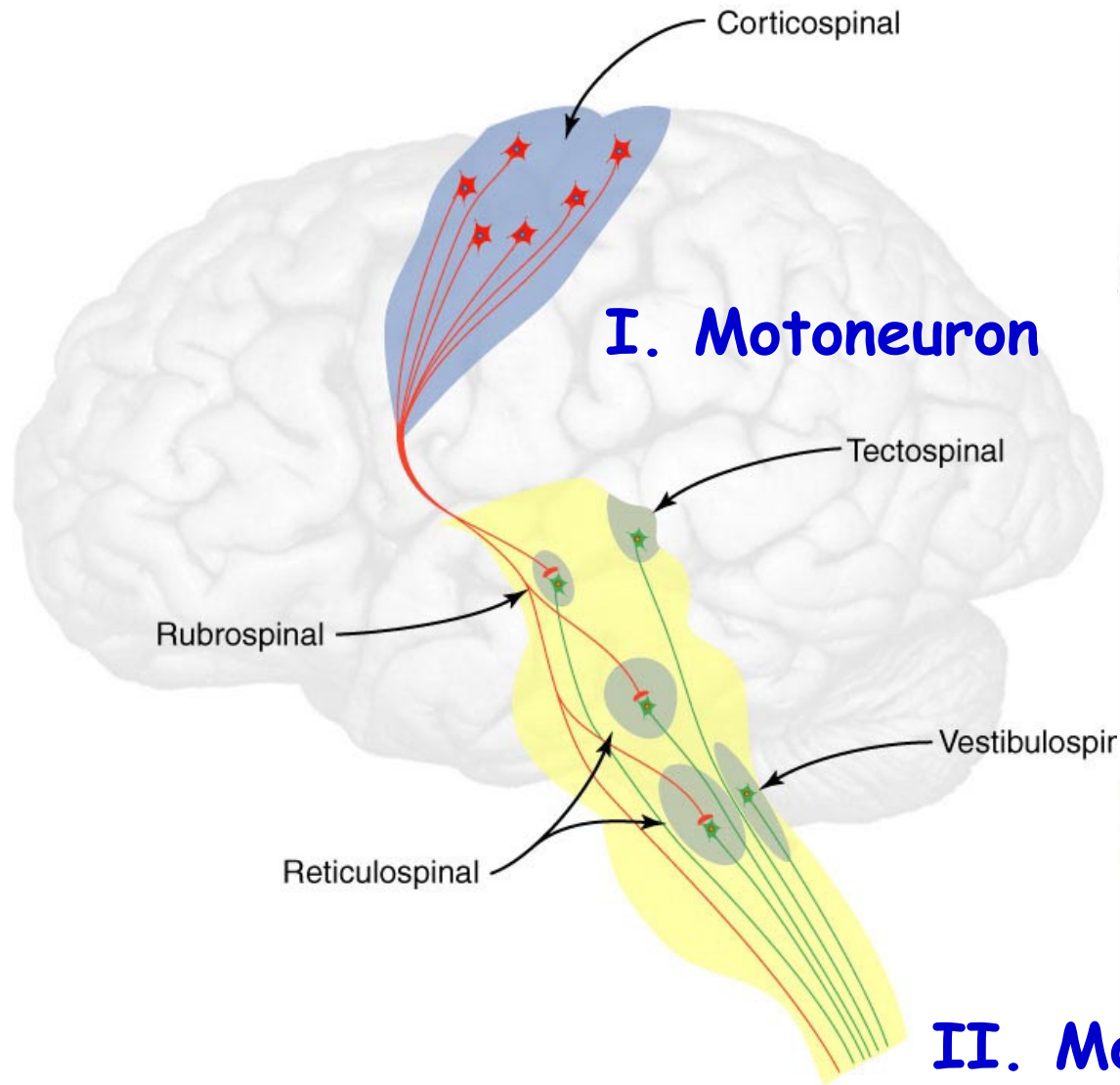
Gyrus precentralis (M)

Motorische Hirnrinde:

Repräsentationsfelder
und Verteilung
Kortikaler Motoneurone
im Gyrus Präcentralis



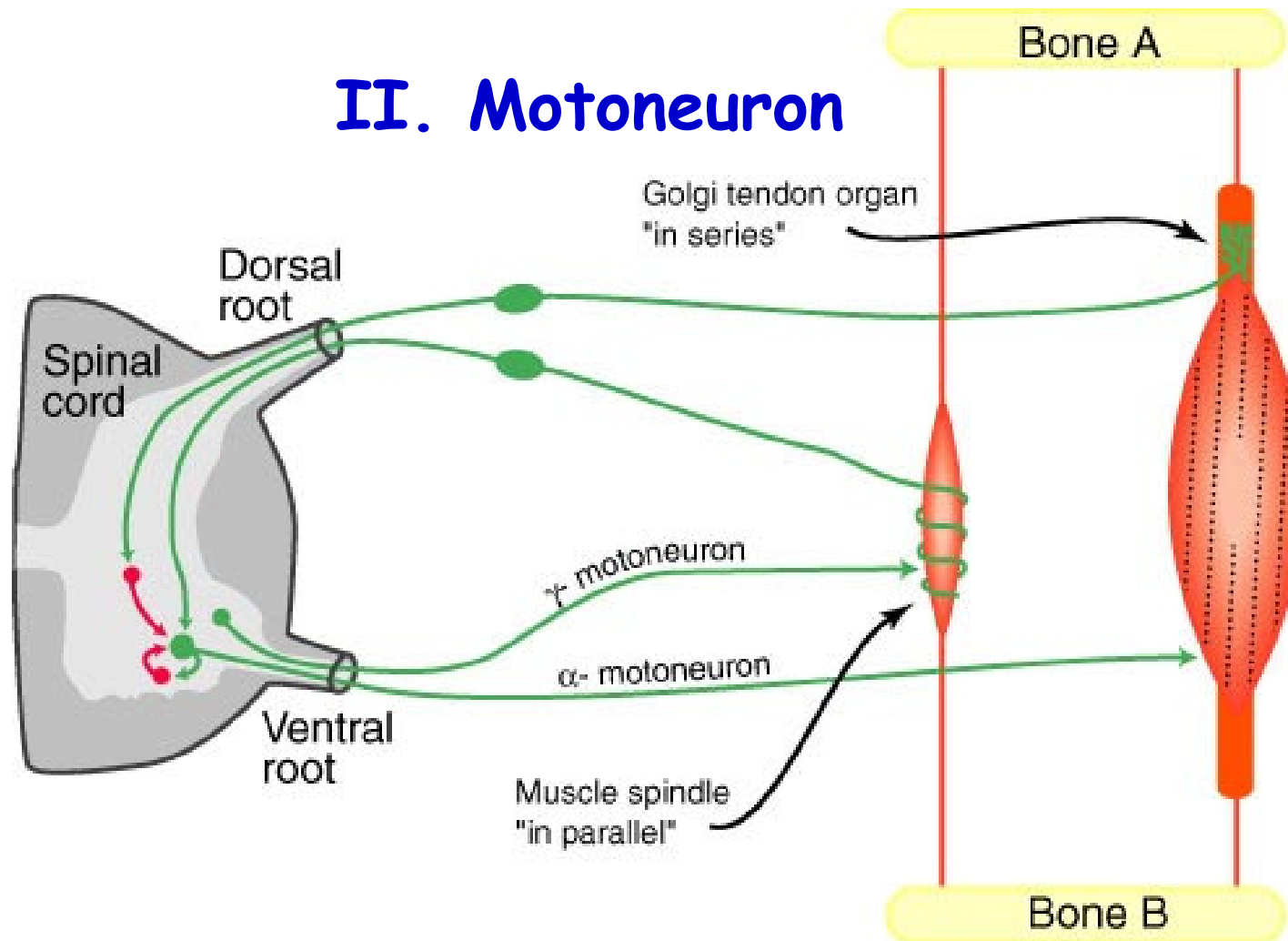
Anatomie des Motorischen Nervensystems I: Kortikale Motoneurone, alte motorische Kontrollzentren im Hirnstamm



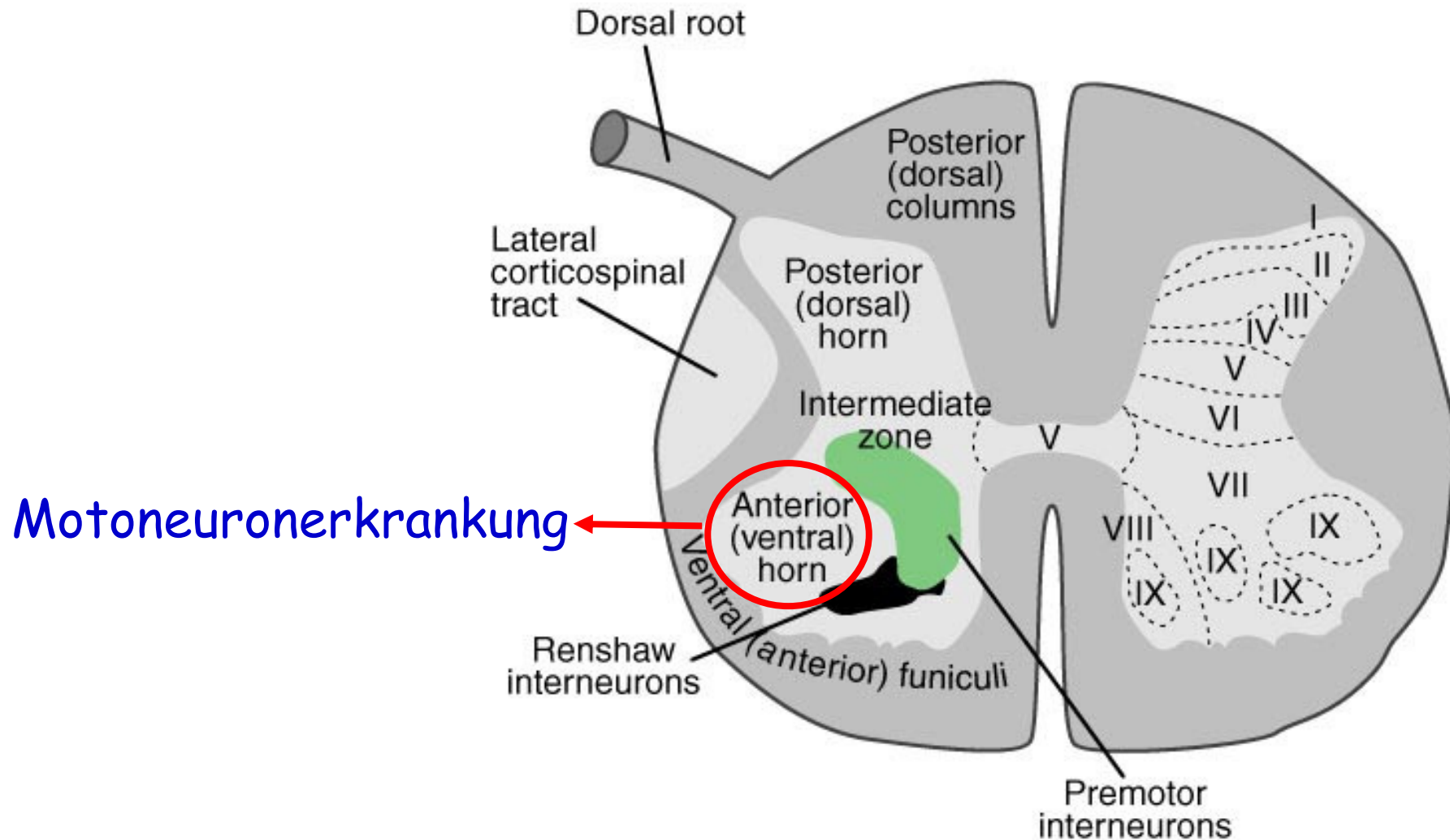
„Forschung und Therapie bei

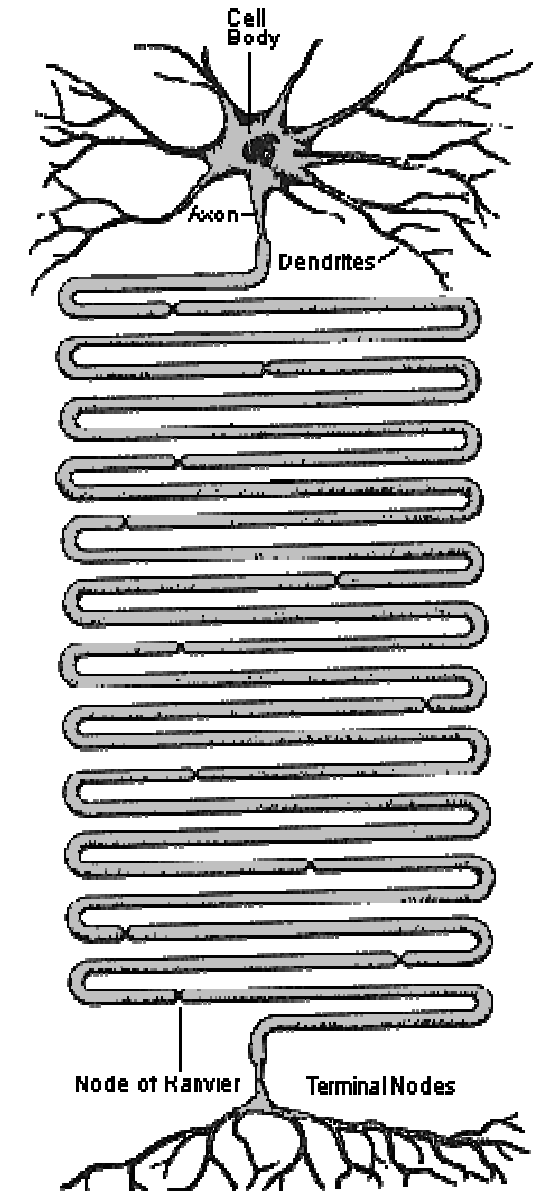
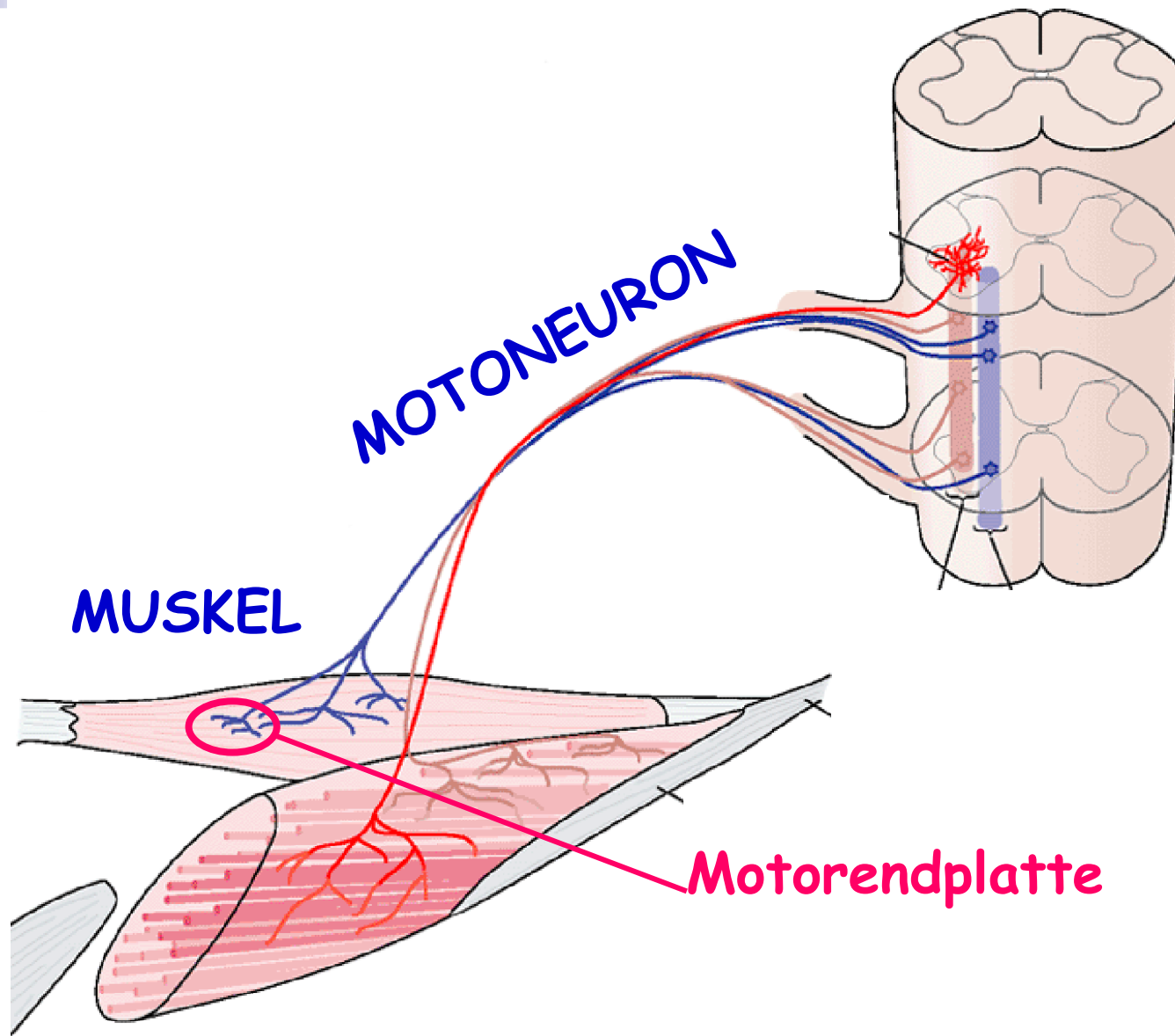
Anatomie des Motorischen Nervensystems II: Rückenmark und spinale Motoneurone

II. Motoneuron

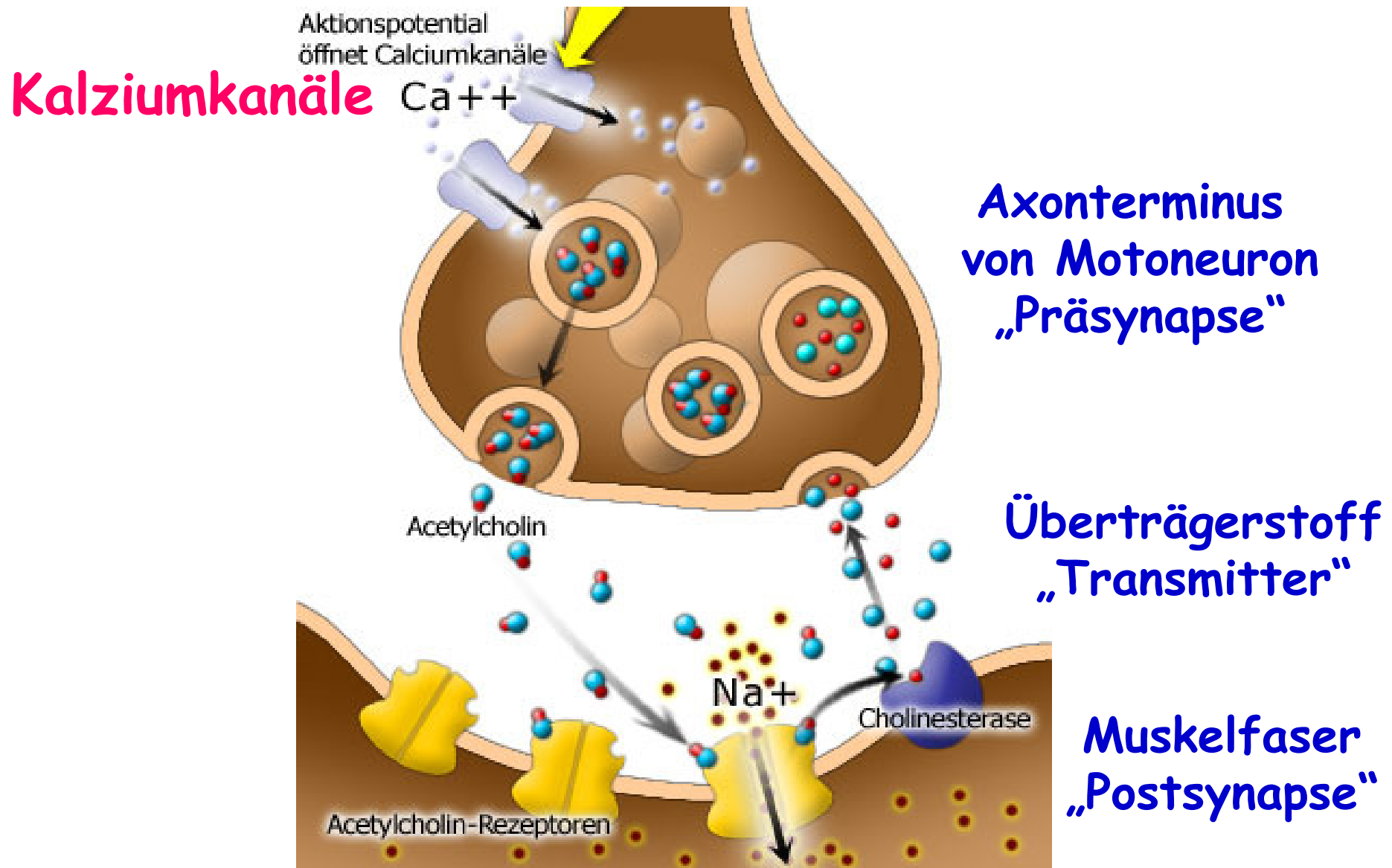


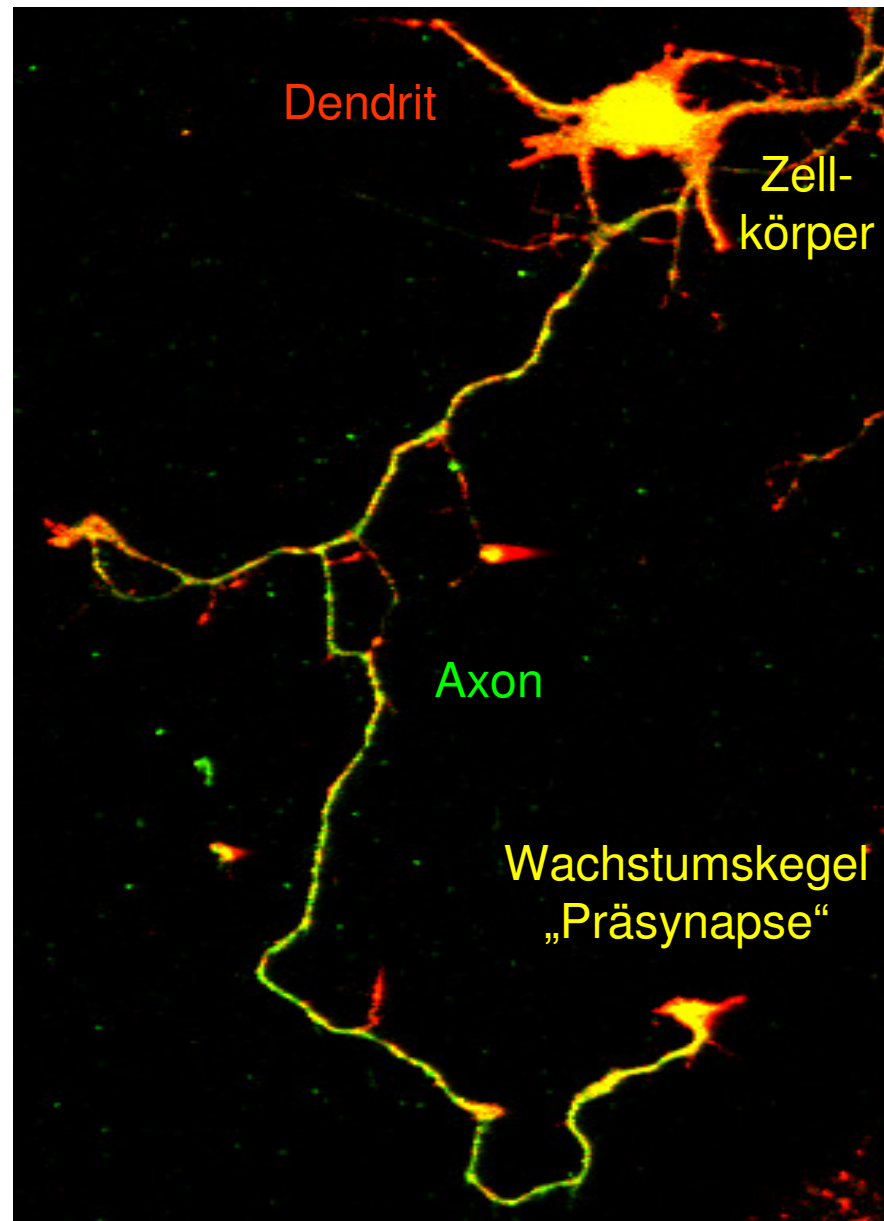
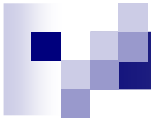
Anatomie des Motorischen Nervensystems II: Rückenmark, Lokalisation von Interneuronen

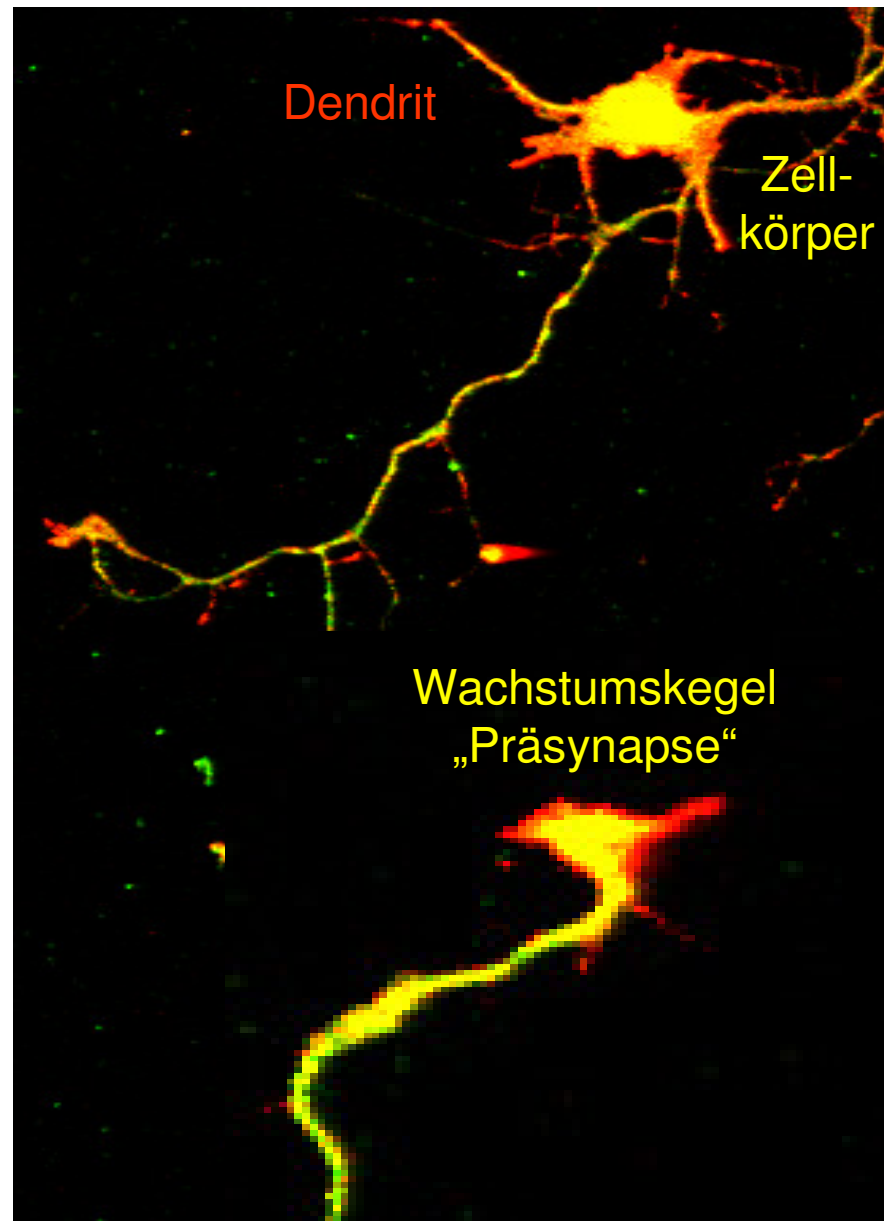
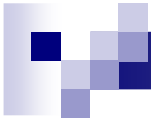




Die Motorendplatte ist eine Synapse







Spinale Muskelatrophie (SMA)

Typ I
(Wernig, Hoffmann)



„floppy“ baby

Typ II und Typ III
(Kugelberg, Welander)



THERAPIE !

Pathomechanismus

Zellkultur

morphologische und
funktionelle Analyse

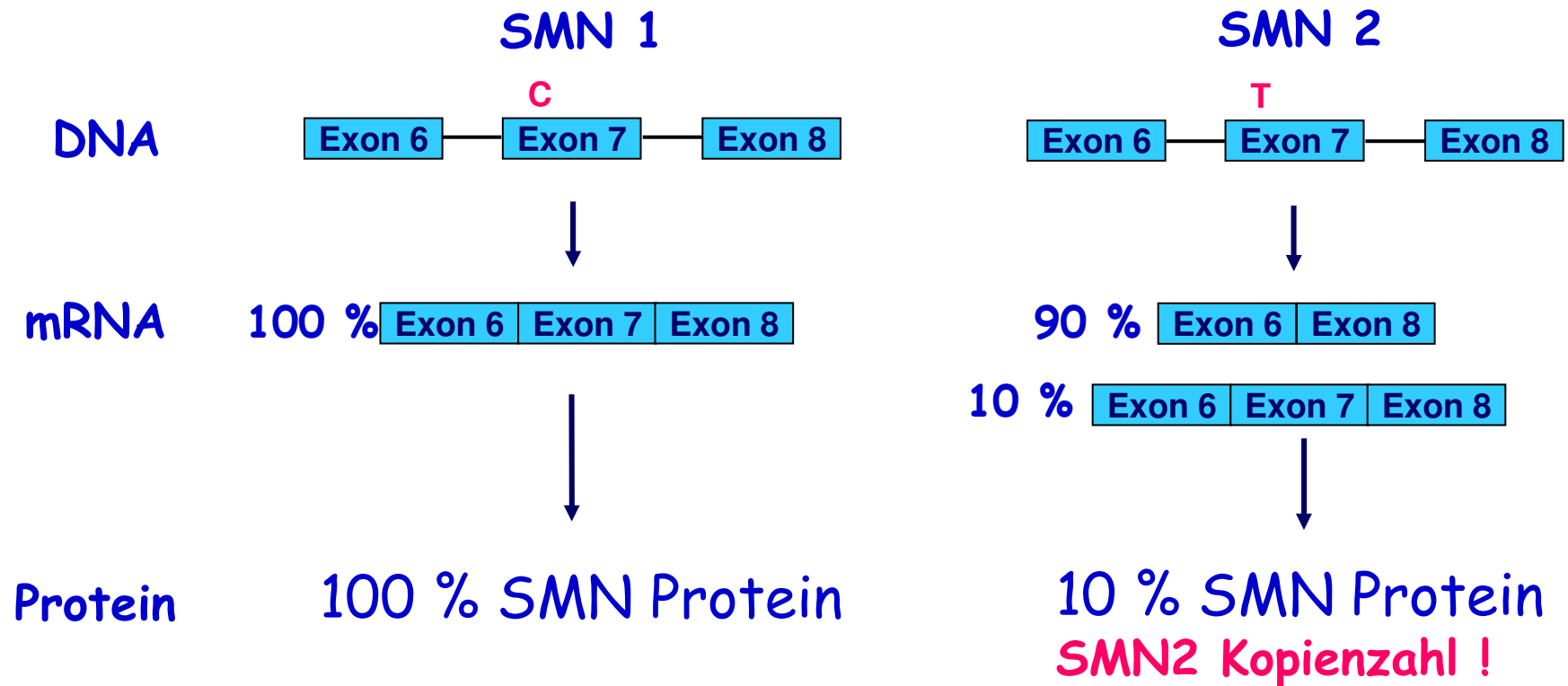
Survival Motor Neuron Gen
„SMN“ (1995)



Mausmodell

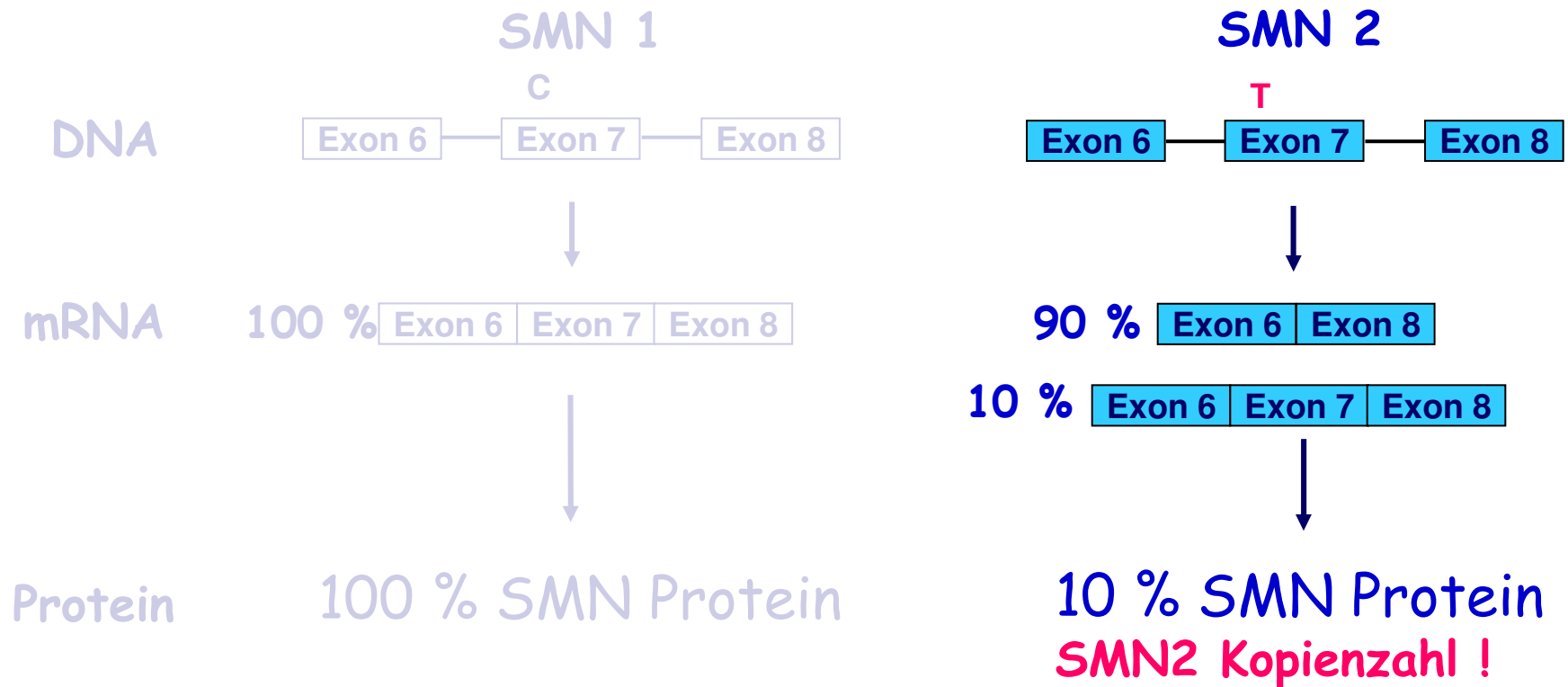
„Forschung und Therapie bei SMA“

Genomische Organisation des humanen *SMN* Gens

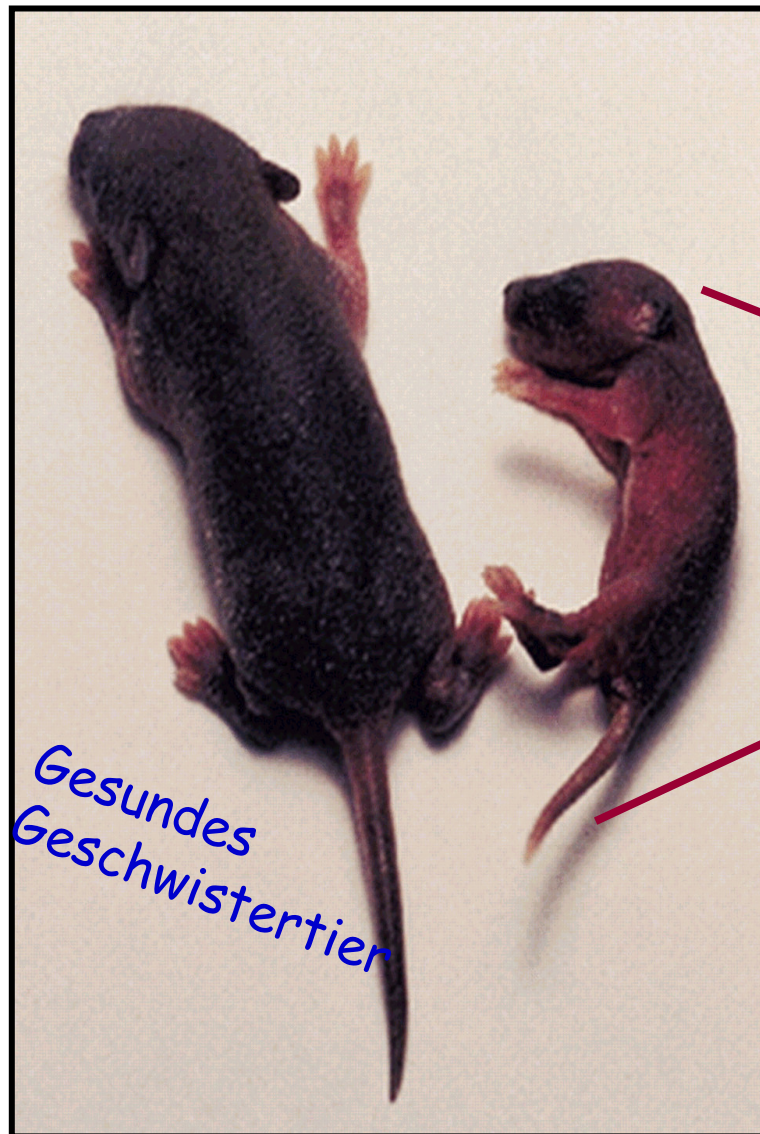


SMN-Gendosis!!!

Genomische Organisation beim SMA Patienten

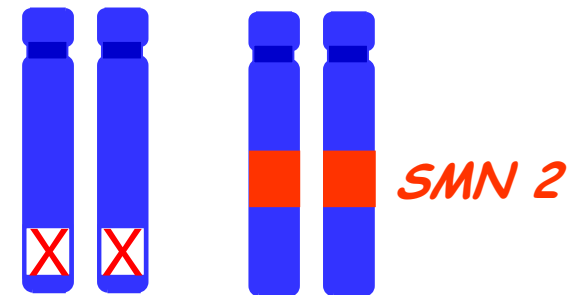


SMN-Gendosis!!!

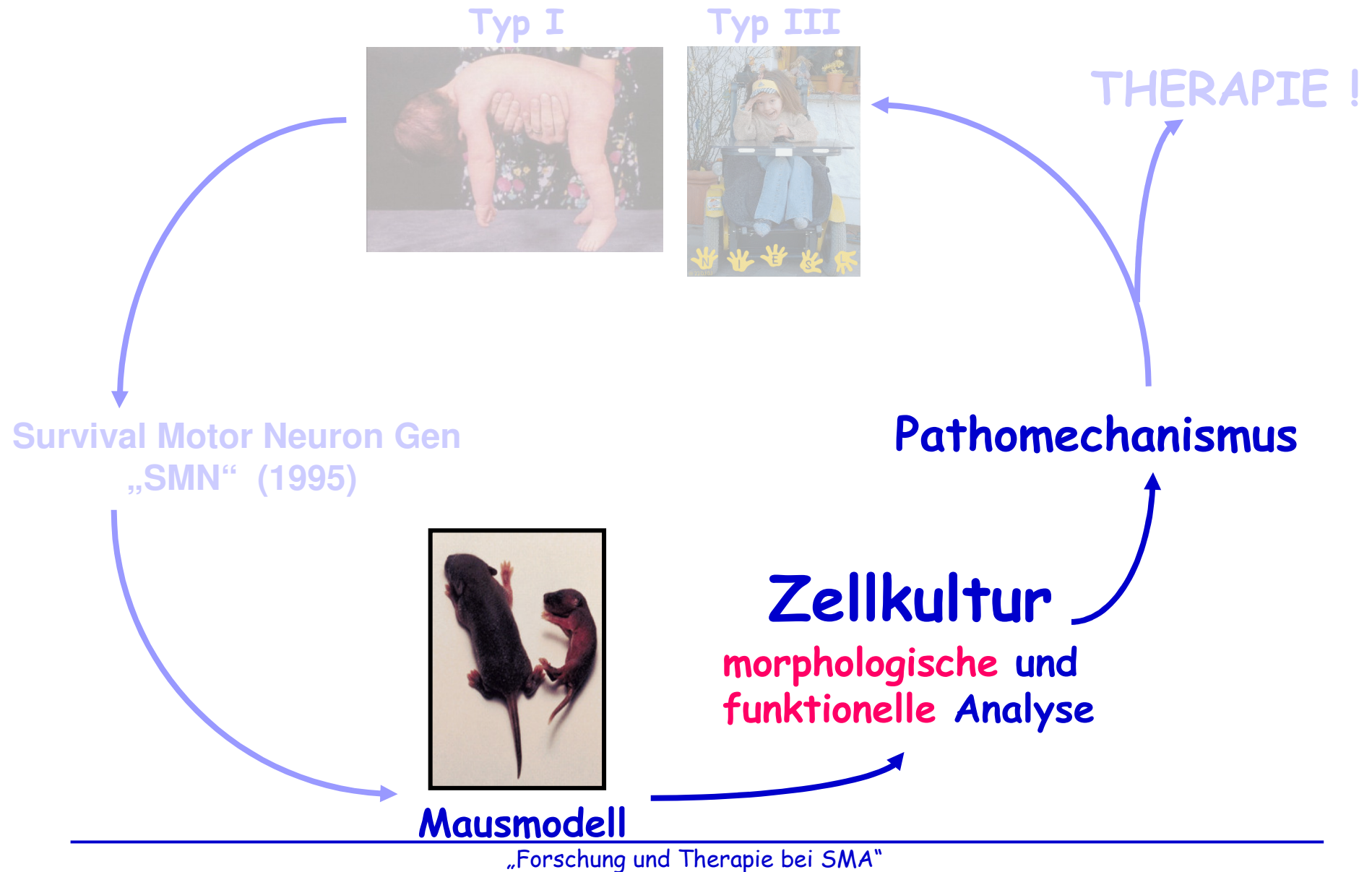


Gesundes
Geschwistertier

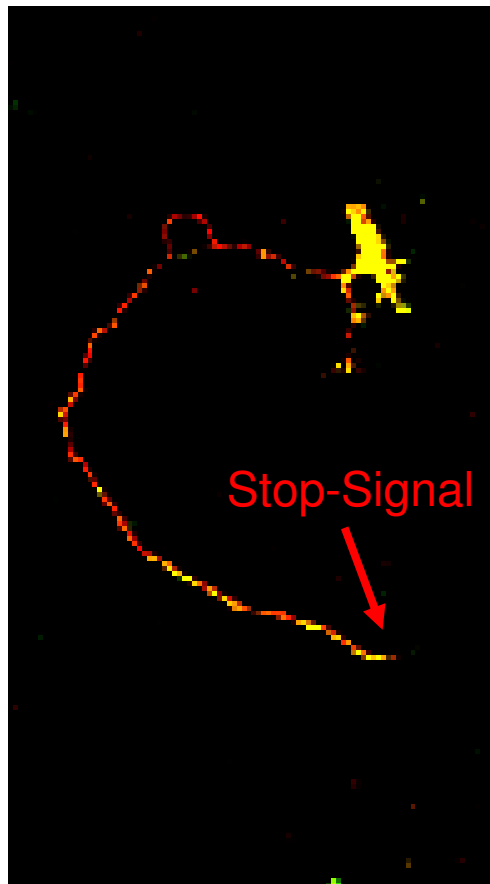
4 Tage alte
Smn^{-/-}; *SMN2* (2 Kopien)
Mausmutante



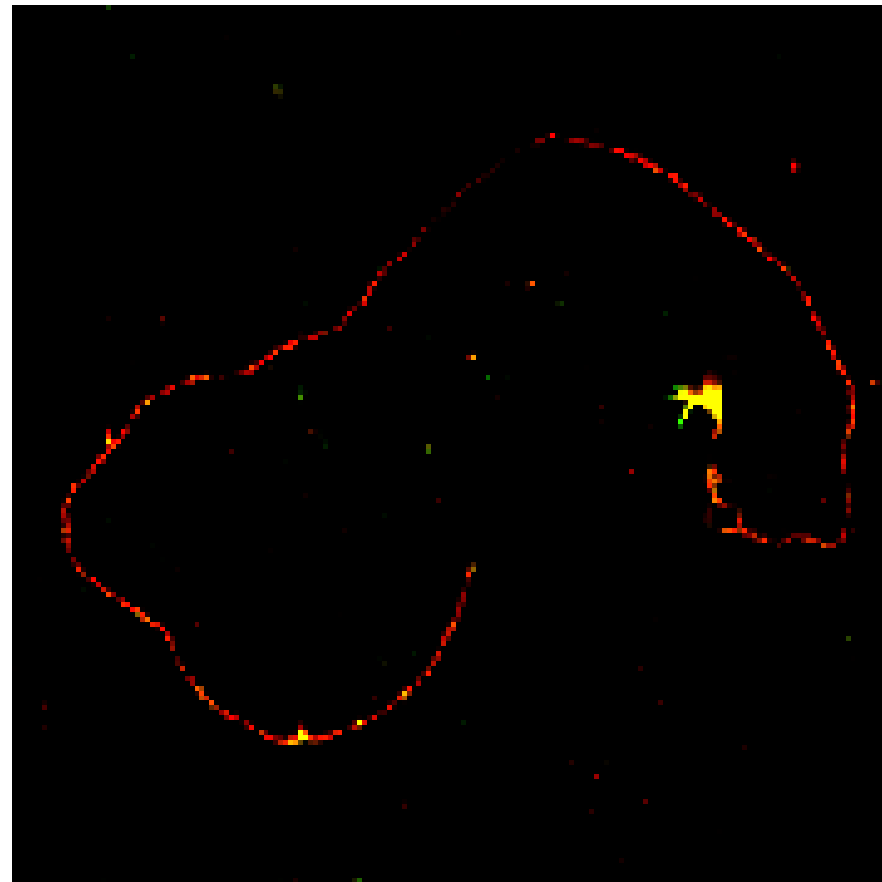
Präsynaptische Motoneuronschädigung?



Wildtypisches Motoneuron



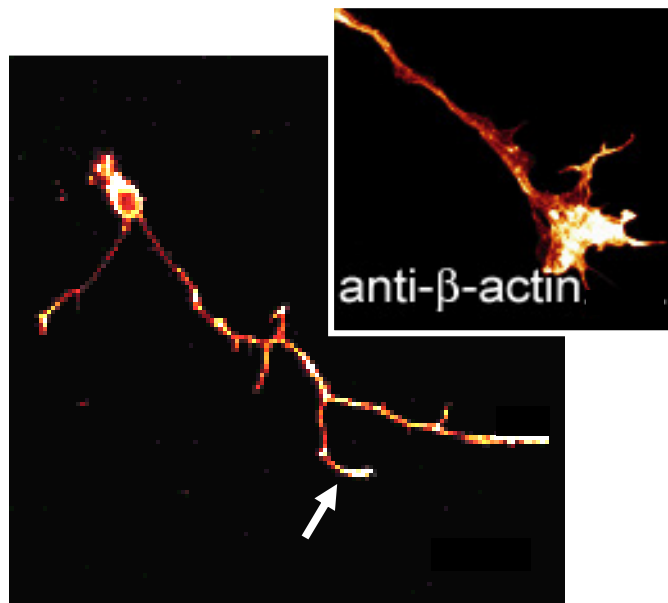
SMA Motoneuron



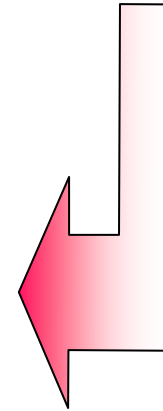
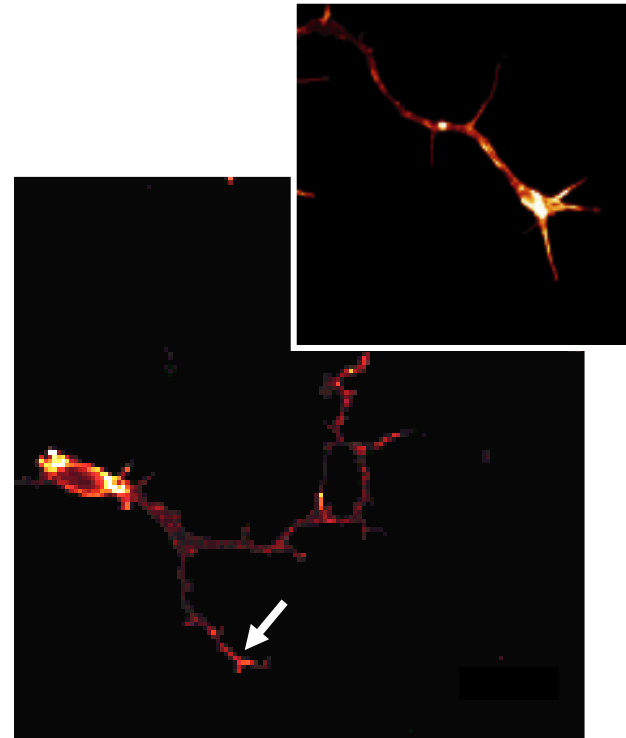
Jablonka et al., JCB 2007

Zu kleiner Wachstumskegel !!!

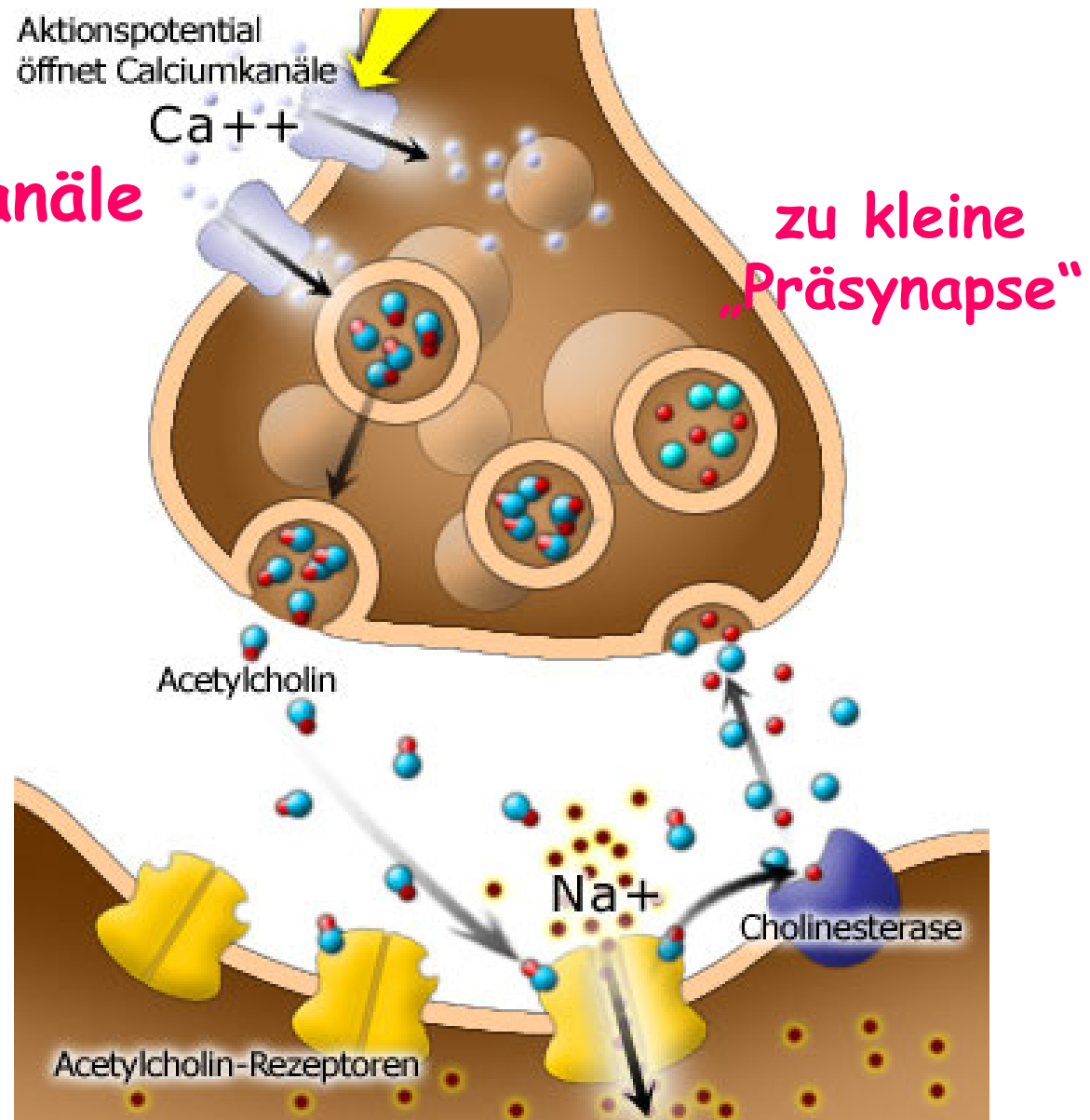
Kontrolle



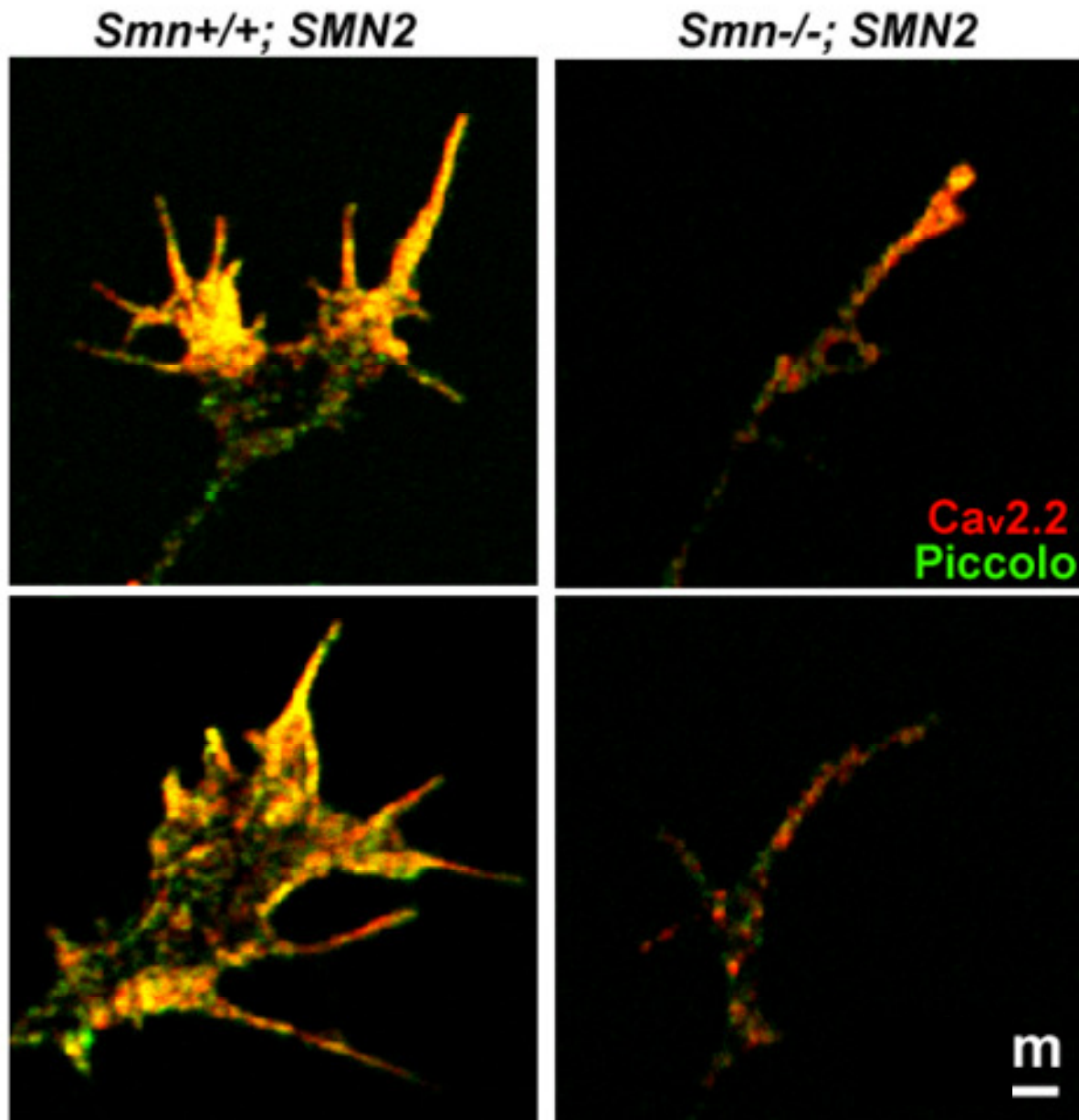
SMA Neuron



Kalziumkanäle



Zu wenig Kalziumionen-Kanäle





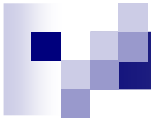
zu kleiner Wachstumskegel

Transmembranproteine

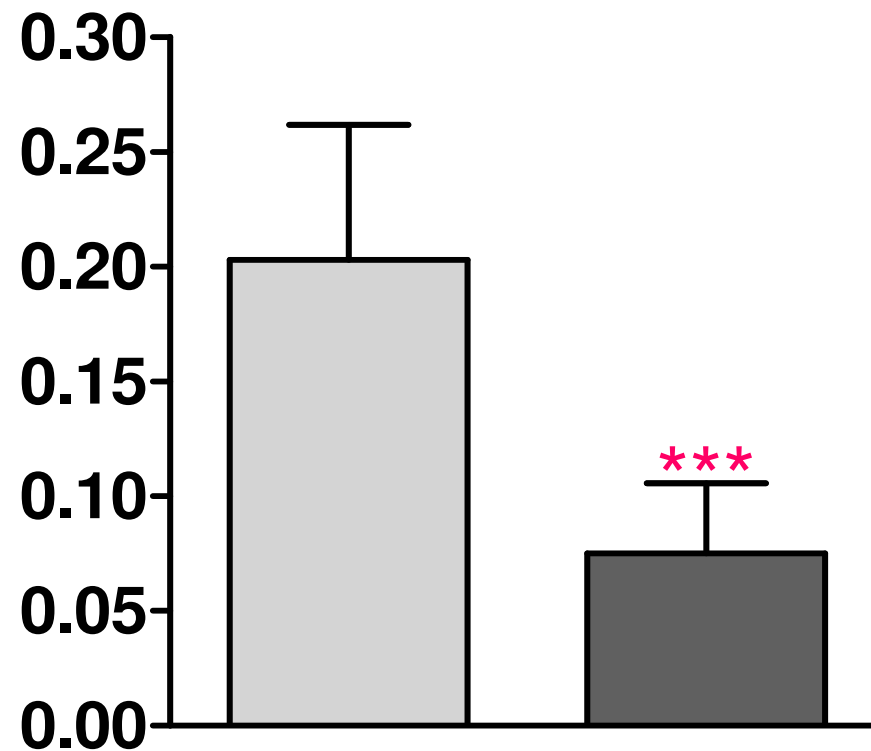
Ionenkanäle

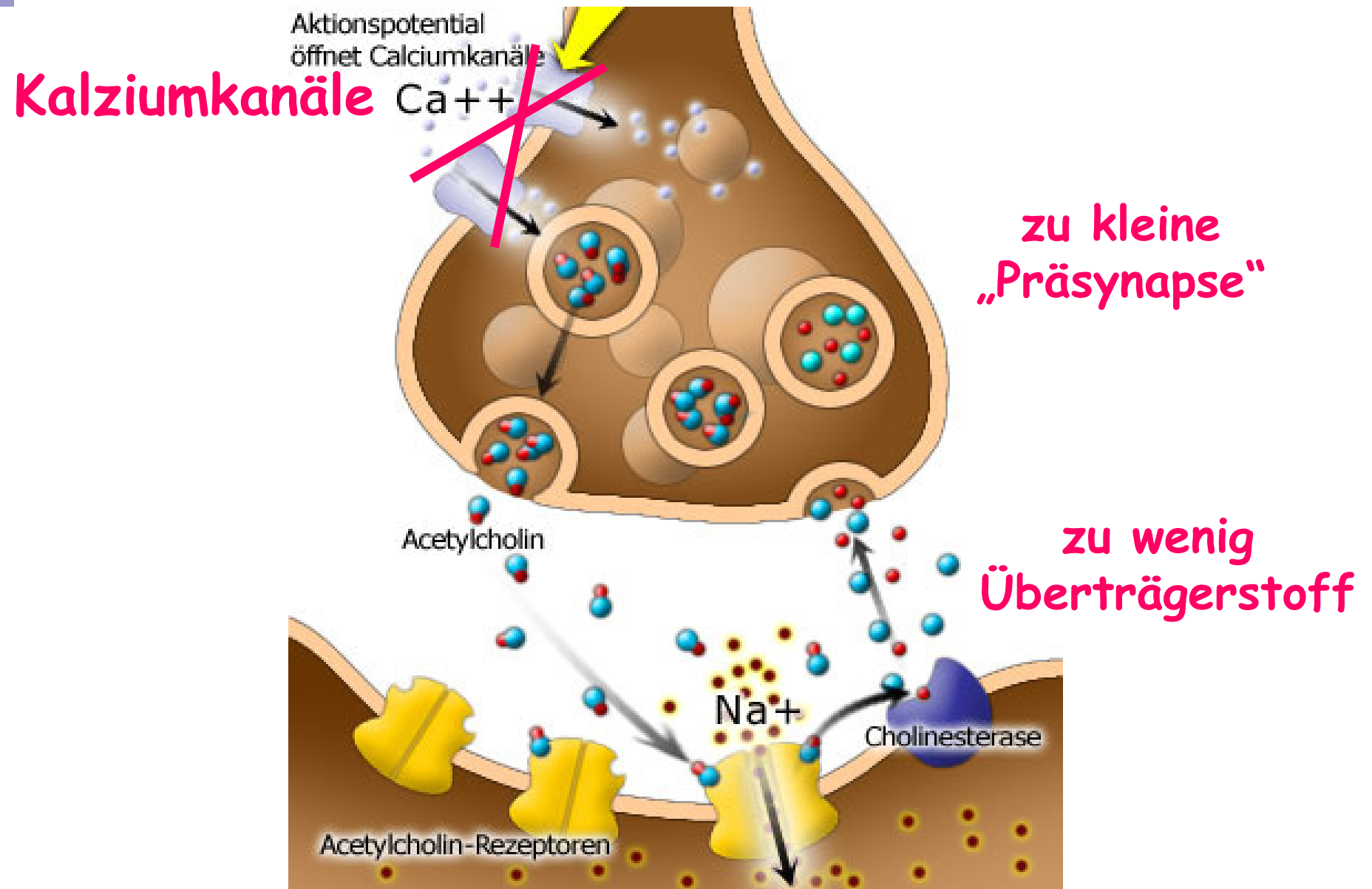
Erregbarkeit





zu geringer Kalziumeinstrom





THERAPIE ???

Typ I



Typ III



THERAPIE !

Survival Motor Neuron Gen
„SMN“ (1995)

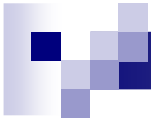
Pathomechanismus

Zellkultur

morphologische und
funktionelle Analyse

Mausmodell

„Forschung und Therapie bei SMA“



Wege zur Therapieentwicklung

1. Erhöhung der SMN Protein Menge

Hochdurchsatz-Screen mit Lymphoblastoiden Zelllinien, Hautfibroblasten von Patienten, primären Motoneuronen oder iPCs

1a. Stimulation der *SMN2* Transkription

HDAC-Inhibitoren
Valproat
Sodiumbutyrat
Phenylbutyrat

1b. Unterdrückung des alternativen Spleissens der *SMN2* mRNA

Synthetische Oligo-Peptide (PNAs), um Enhancer Splice-Site zu rekonstruieren

Zelltyp-unspezifisch!

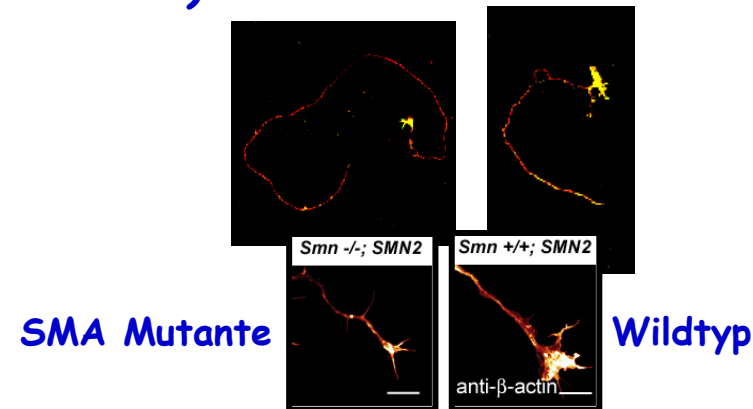
1c. Gabe von exogenem SMN

2. Symptomatische Therapie

a) SMA Mausmodell



b) Motoneuronen Kultur



Verändertes Axonwachstum

Behandlung des Axondefekts

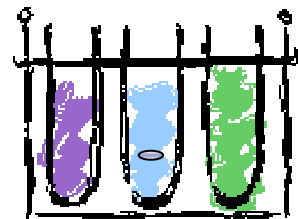


Testsysteme

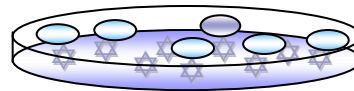
- Zellkulturen
primäre Motoneurone und iPCs
- Mausmodelle
- Klinische Studien

Primäre isolierte Motoneurone

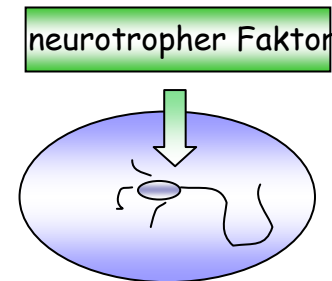
- E 13,5 Maus > Zellkultur
- embryonales Rückenmark (1-2 % Motoneurone)
- 7 Tage in Kultur mit neurotrophem Faktor (1 ng/ml)
- Fixierung und Immunhistochemie
- Auswertung am konfokalen Mikroskop, Längenmessungen



Rückenmarks-
Zellsuspension



Motoneuronspezifisches
Epitop





iPS

Alternative zu primären Motoneuronen aus Mausembryonen

Hautfibroblasten von SMA Patienten

Lentivirale Überexpression von Transkriptionsfaktoren die aus einer Hautzelle ein Motoneuron machen.

Testen auf zelltypspezifische Charakteristika von Motoneuronen im Vergleich SMA Patient und Kontrollperson



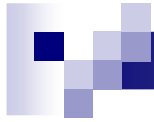
Mausmodelle

SMA Typ I *Smn*^{-/-}; *SMN2* eine Woche

SMA Typ II *Smn*^{-/-}; *SMN2*; *delEx7* zwei Wochen

Smn^{-/-}; *SMN2* (*high copy*) zwei Wochen

SMA Typ III-IV *Smn*^{+/-} 1 bis 2 Jahre



„Proof of Principle“

Test mit primären SMA Typ I
Motoneuronen



Erste Schritte für eine therapeutische Strategie

Substanzen, die den morphologischen und funktionellen Defekten entgegenwirken

zyklisches AMP (cAMP)

stimuliert spontane Ca^{2+} Einstürme
stimuliert Smn Transkription

HDAC-Inhibitoren

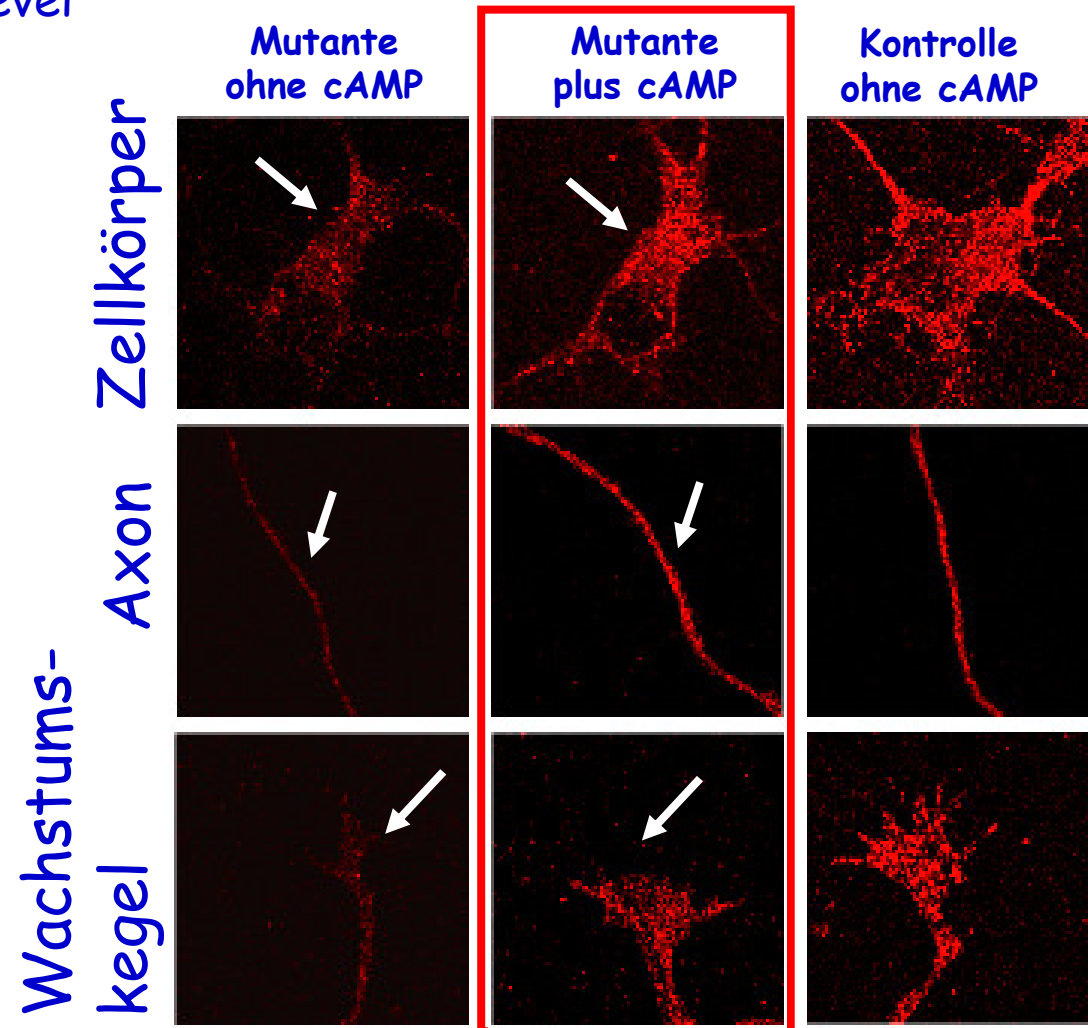
stimulieren Smn Transkription

Behandlung.....

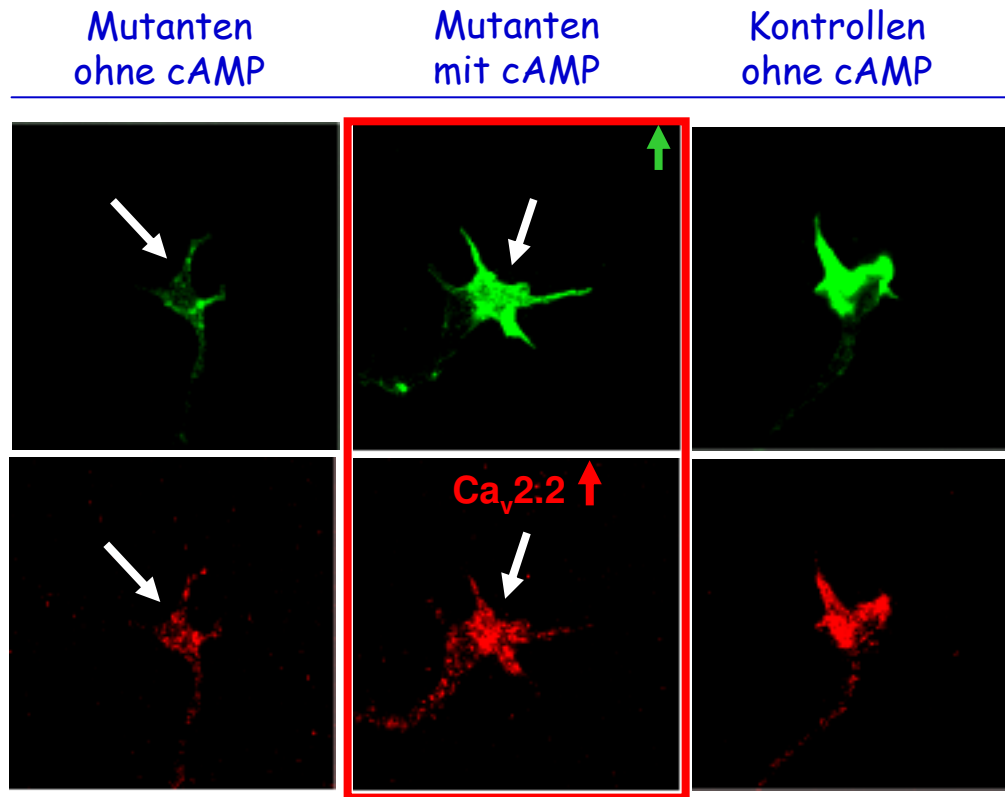
- des Axondefekts
- des Kalziumkanal-Defizits
- der verminderten Erregbarkeit

Erhöhte Smn/SMN Proteinmenge

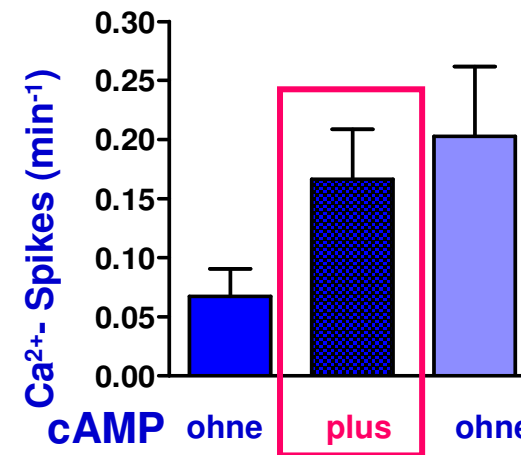
...stimuliert Smn/SMN2 Transkription Primär kultivierte Motoneurone
...erhöht Smn/SMN Proteinlevel



cAMP kompensiert morphologische und funktionelle Defekte

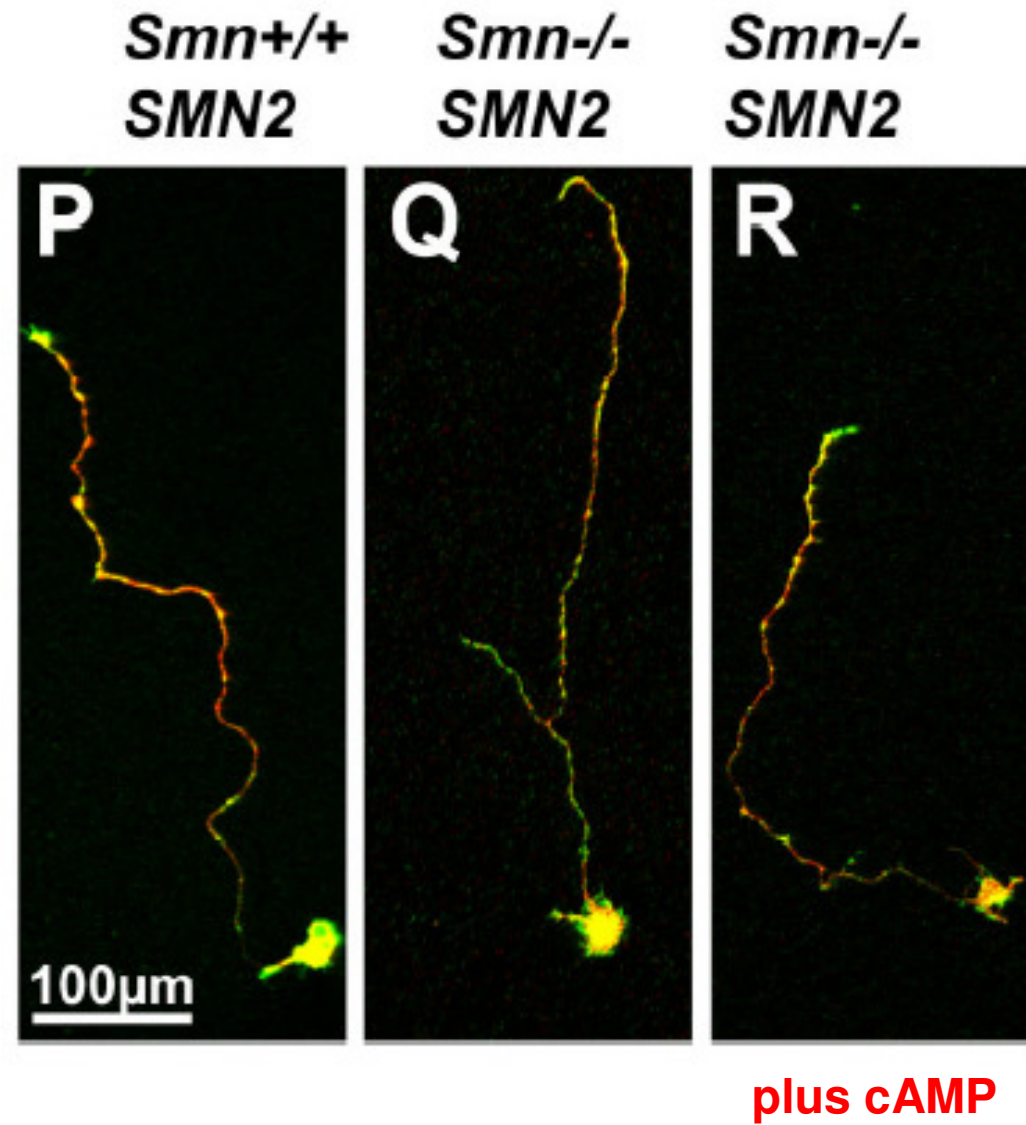
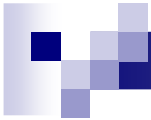


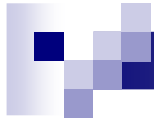
Erhöhte Erregbarkeit



Vergrößerter Wachstumskegel,
mehr Kalziumkanäle

Jablonka et al., JCB 2007





Überleben

Morphologie

Funktionalität

Therapeutische Strategien

Keine Zellteilung mehr

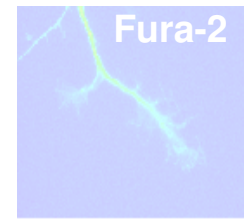
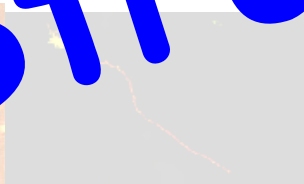
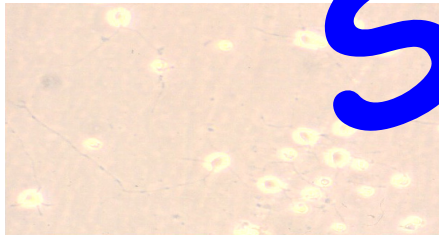
Verändertes Axonwachstum

Ca_v2.2-Defizit in Axonterminalen

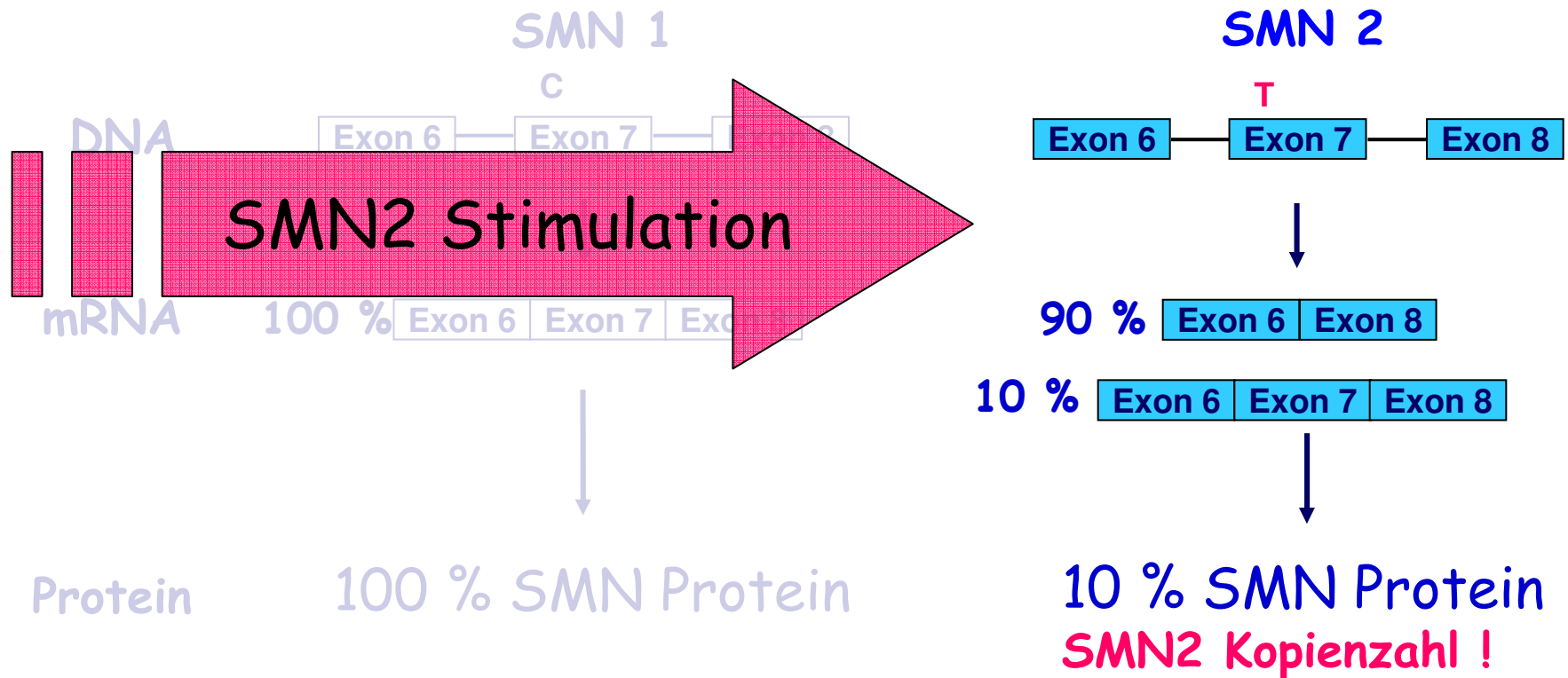
Kleinere Wachstumskegel

Verminderte Erregbarkeit

β-Aktin-Defizit



1. Erhöhung der SMN Proteinmenge

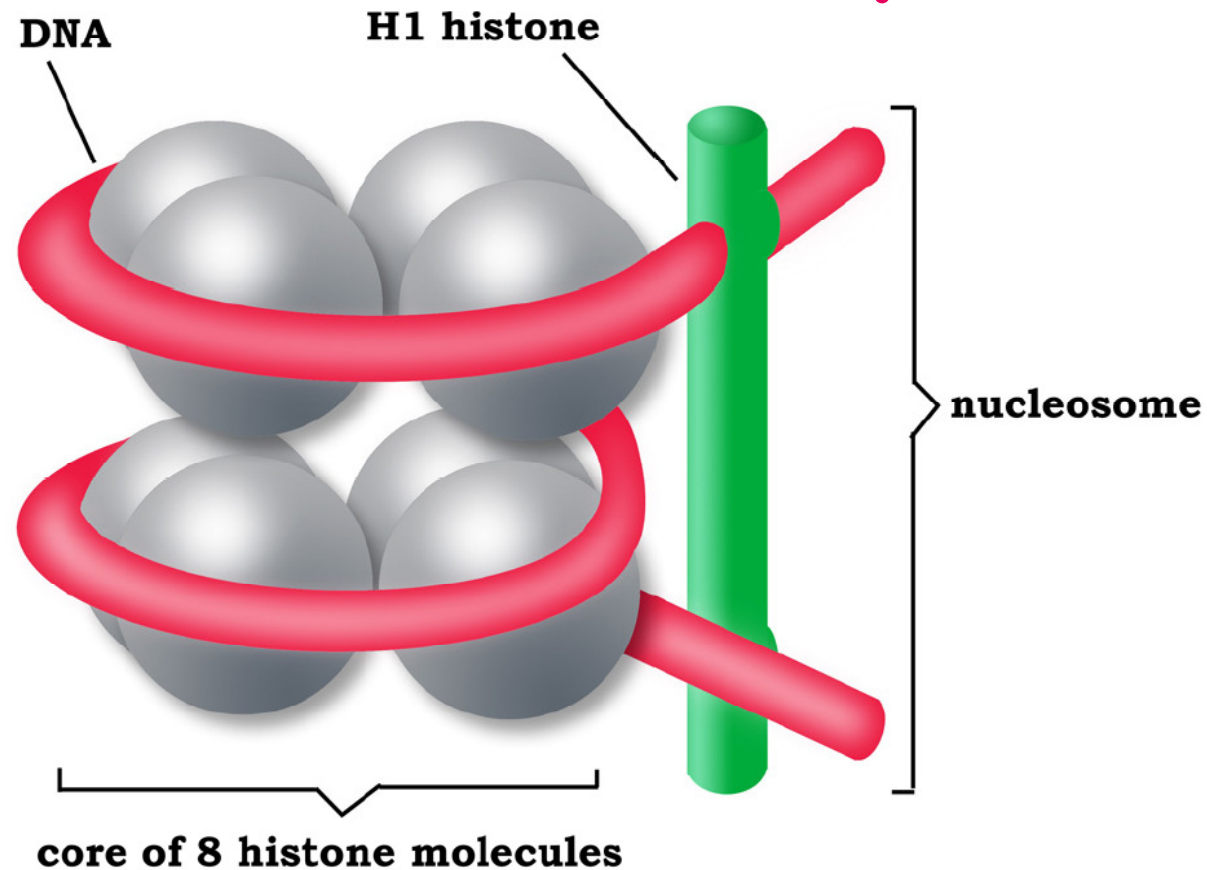


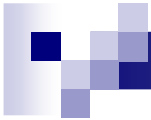
SMN-Gendosis ↑

Histondeacetylase (HDAC) Inhibitoren

Sodiumbutyrat
Trichostatin

Valproat



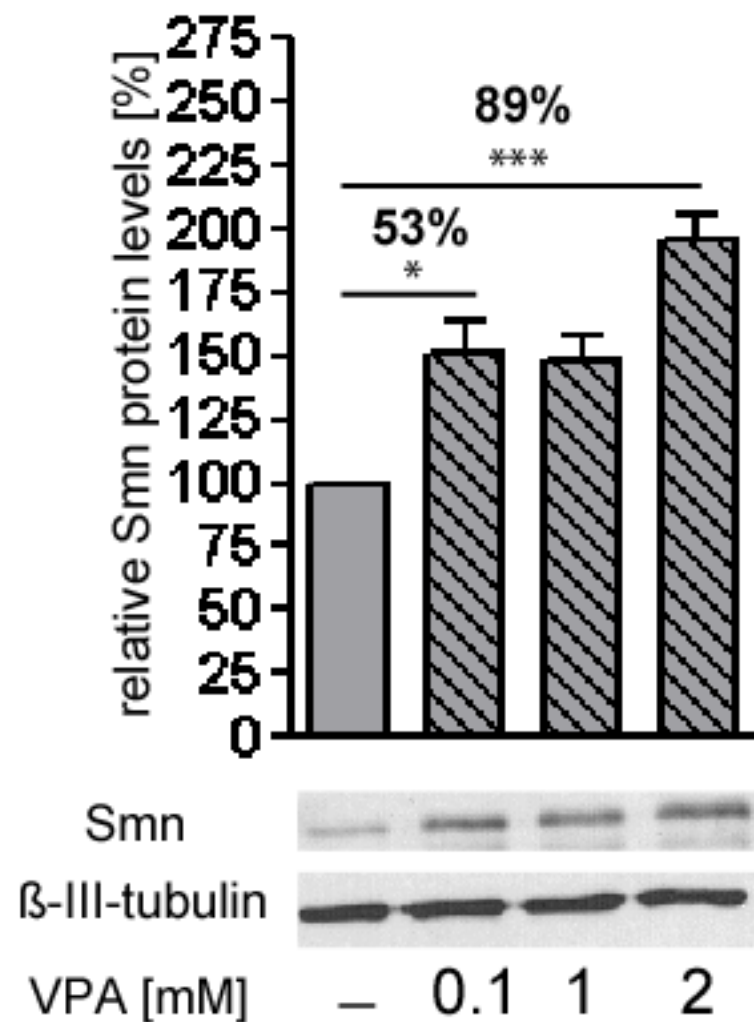


Valproic acid increases the SMN2 protein level: a well-known drug as a potential therapy for spinal muscular atrophy

**L. Brichta^{1,2}, Y. Hofmann¹, E. Hahnen³, F. A. Siebzehnruhl³, H. Raschke¹,
I. Blumcke³, I. Y. Eyupoglu⁴ and B. Wirth^{1,2,*}**

Valproic Acid Increases SMN Levels in Spinal Muscular Atrophy Patient Cells

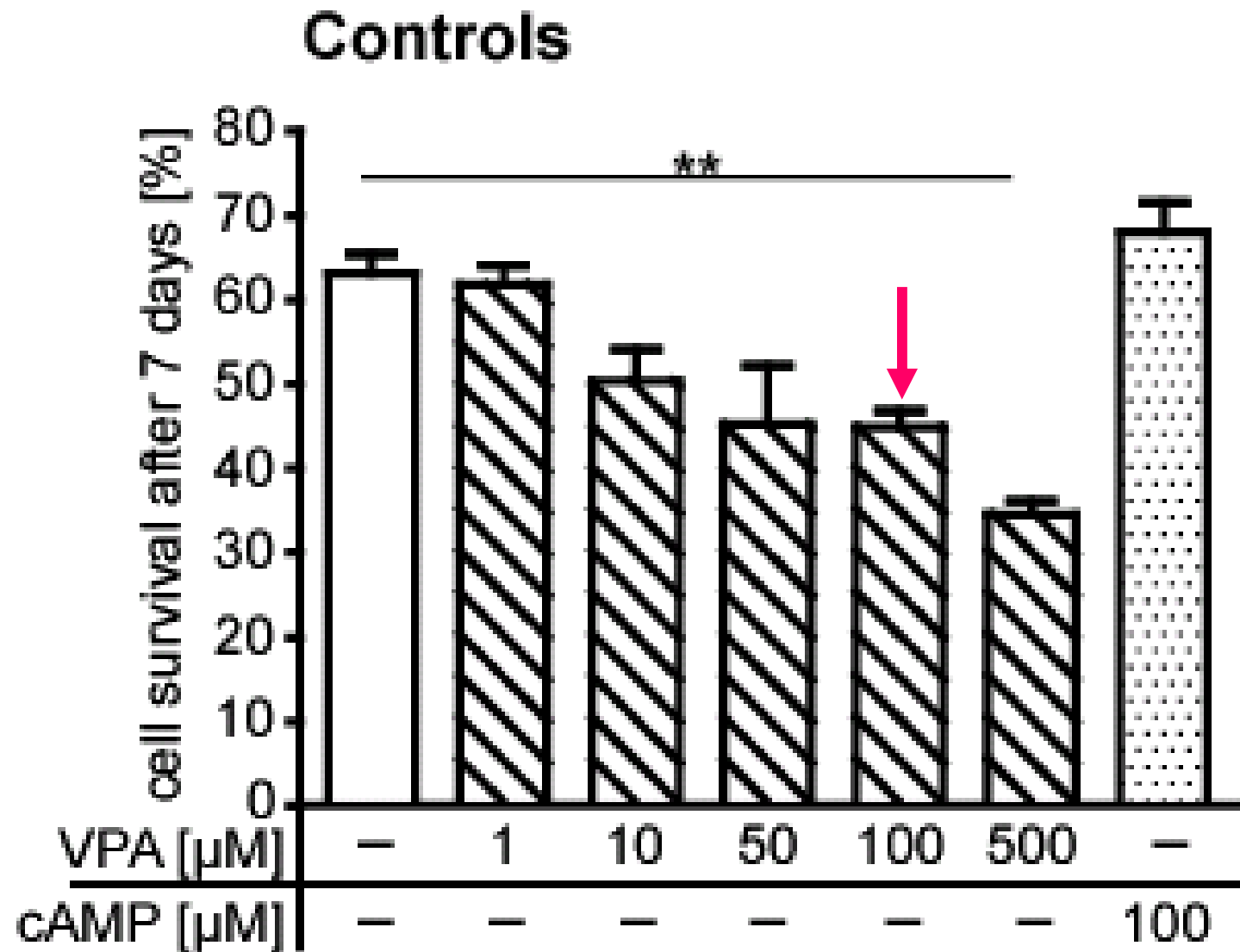
Charlotte J. Sumner, MD,¹ Thanh N. Huynh, BS,¹ Jennifer A. Markowitz, BS,¹ J. Stephen Perhac, BA,¹
Brenna Hill, BS,² Daniel D. Coovert, PhD,³ Kristie Schussler, BS,³ Xiaocun Chen, MS,⁴ Jill Jarecki, PhD,⁴
Arthur H. M. Burghes, PhD,^{3,5,6} J. Paul Taylor, MD, PhD,¹ and Kenneth H. Fischbeck, MD¹



VPA erhöht die SMN Menge

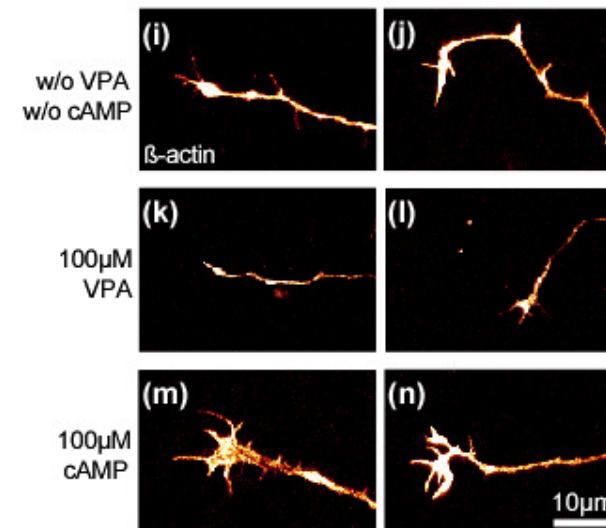
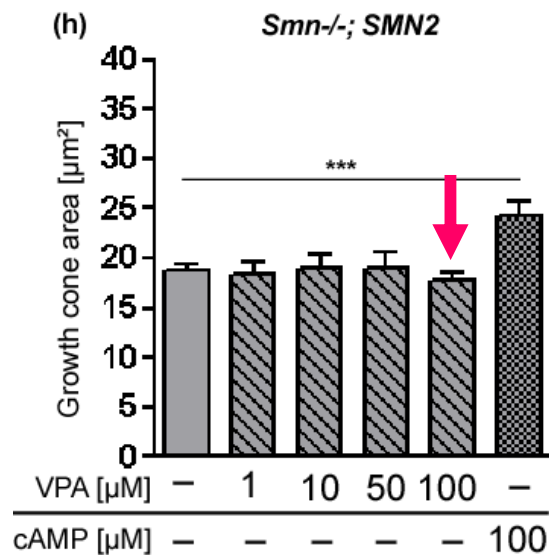
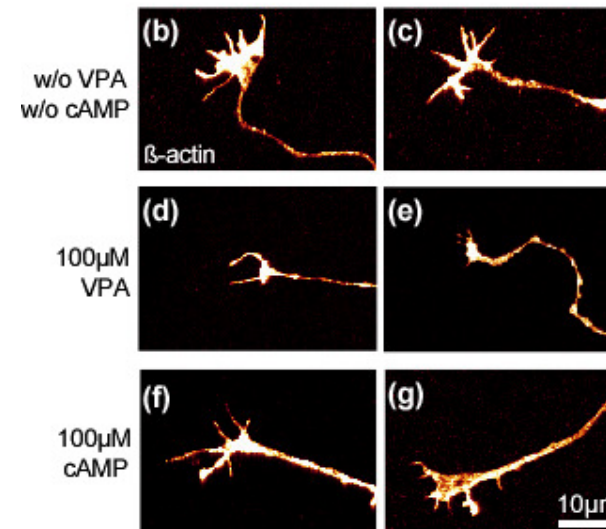
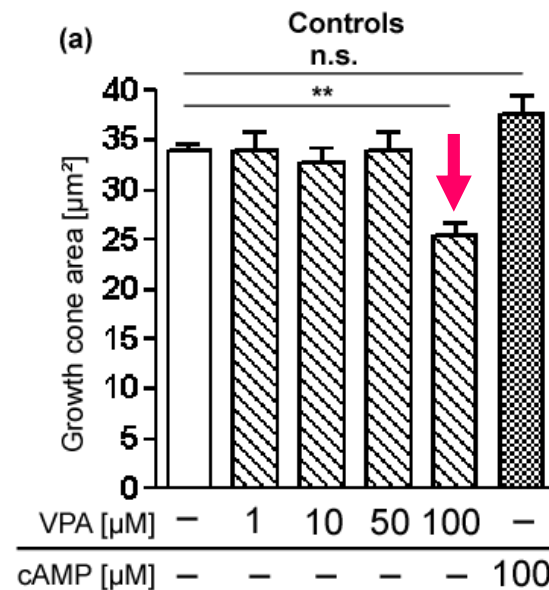
Rak et al., NBD 2009

VPA ist neurotoxisch



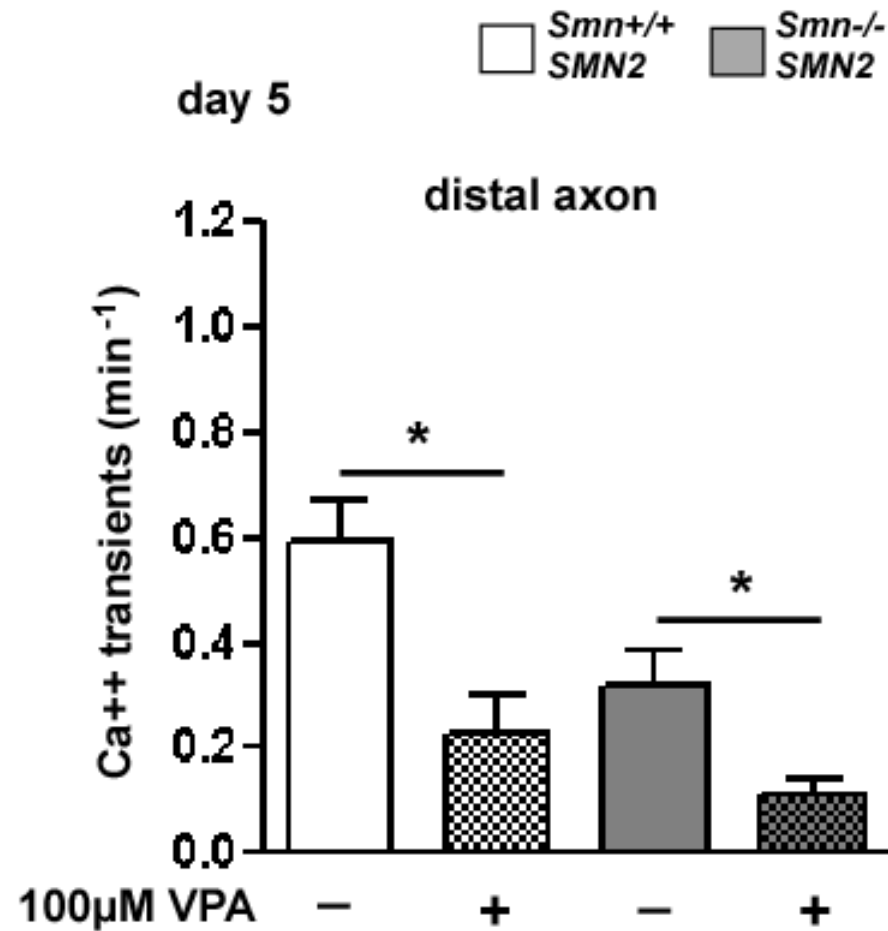
Rak et al., NBD 2009

VPA reduziert die Wachstumskegelgröße

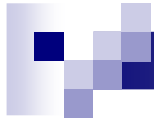


Rak et al., NBD 2009

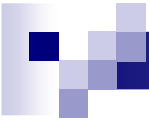
VPA reduziert die Erregbarkeit



Rak et al., NBD 2009



**Trotz Erhöhung der SMN Proteinmenge
wirkt VPA neurotoxisch, da es Ionenkanäle
blockiert !!!**



HDACs

Zellkultur

Erhöhung der SMN Menge

LBH589 (Garbes et al., 2009)
M344 (Riessland et al., 2006)
Valproat (Brichta et al., 2003)
(Rak et al., 2009)

SMA Mausmodell

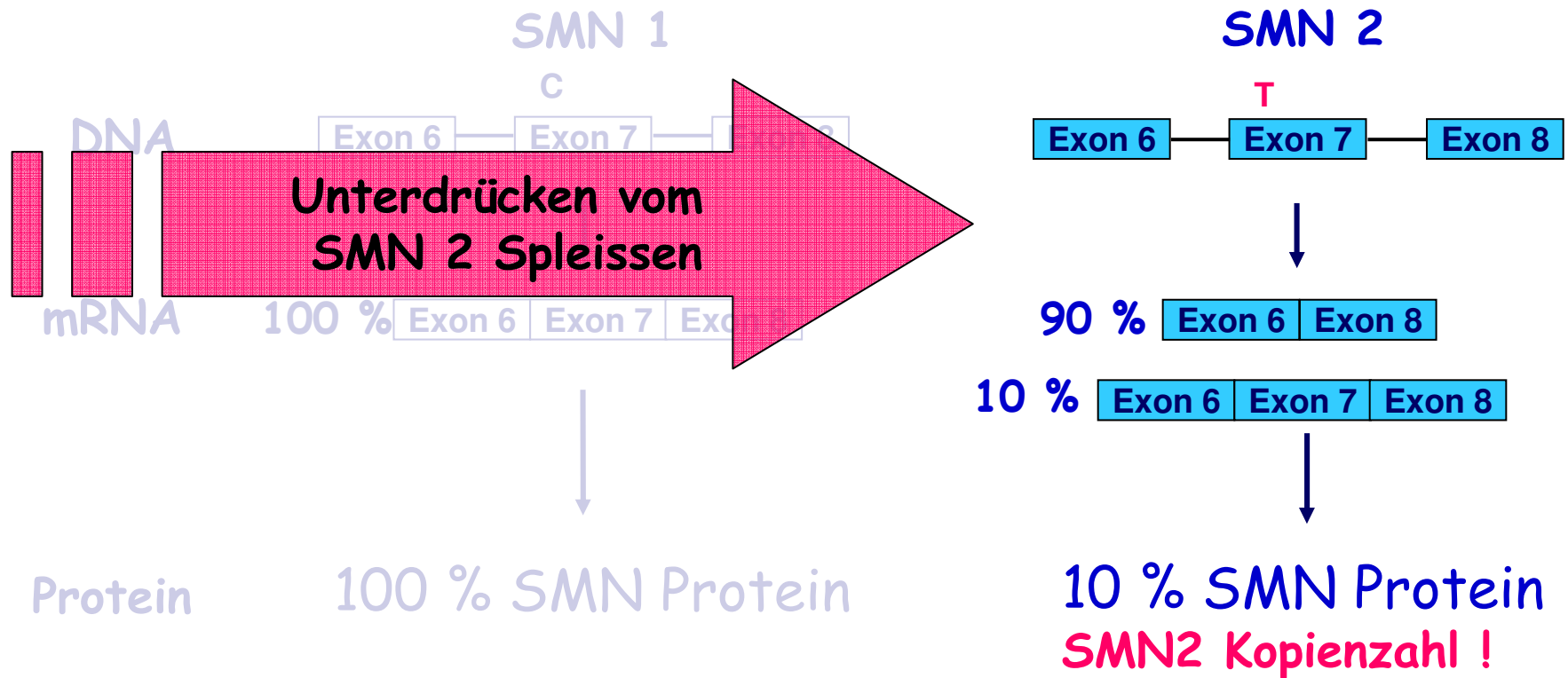
Erhöhung der Überlebensrate

Quinazoline (Butchbach et al., 2010)
SAHA (Riessland et al., 2010)
Valproat (Tsai et al., 2008)
Trichostatin A (Avila et al., 2007)
Sodium butyrate (Chang et al., 2001)

Klinische Studien

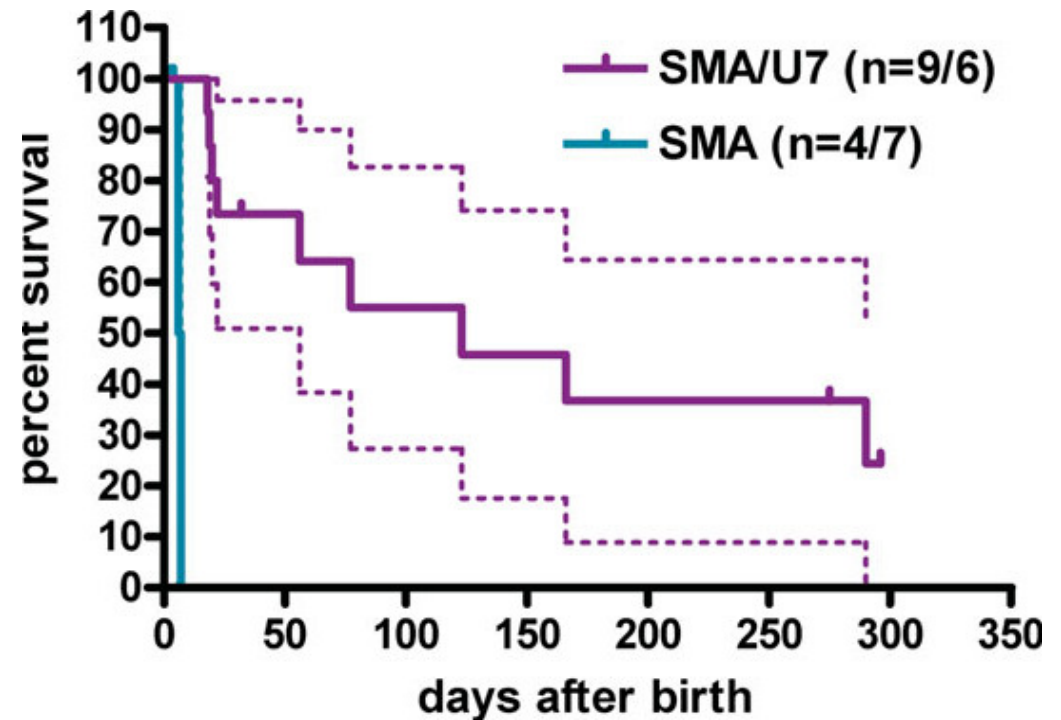
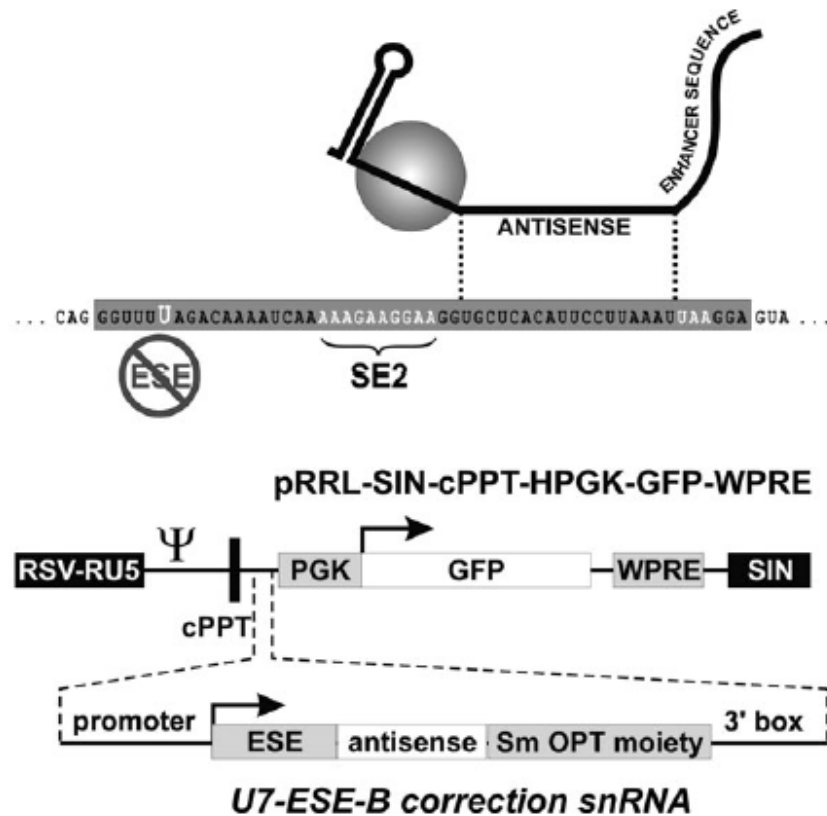
Phase II, Valproat, Typ II Patienten kein Effekt
Swoboda et al., 2009

1. Erhöhung der SMN Proteinmenge



SMN-Gendosis ↑

U7 snRNA splicing modulation prolongs survival of SMA mice



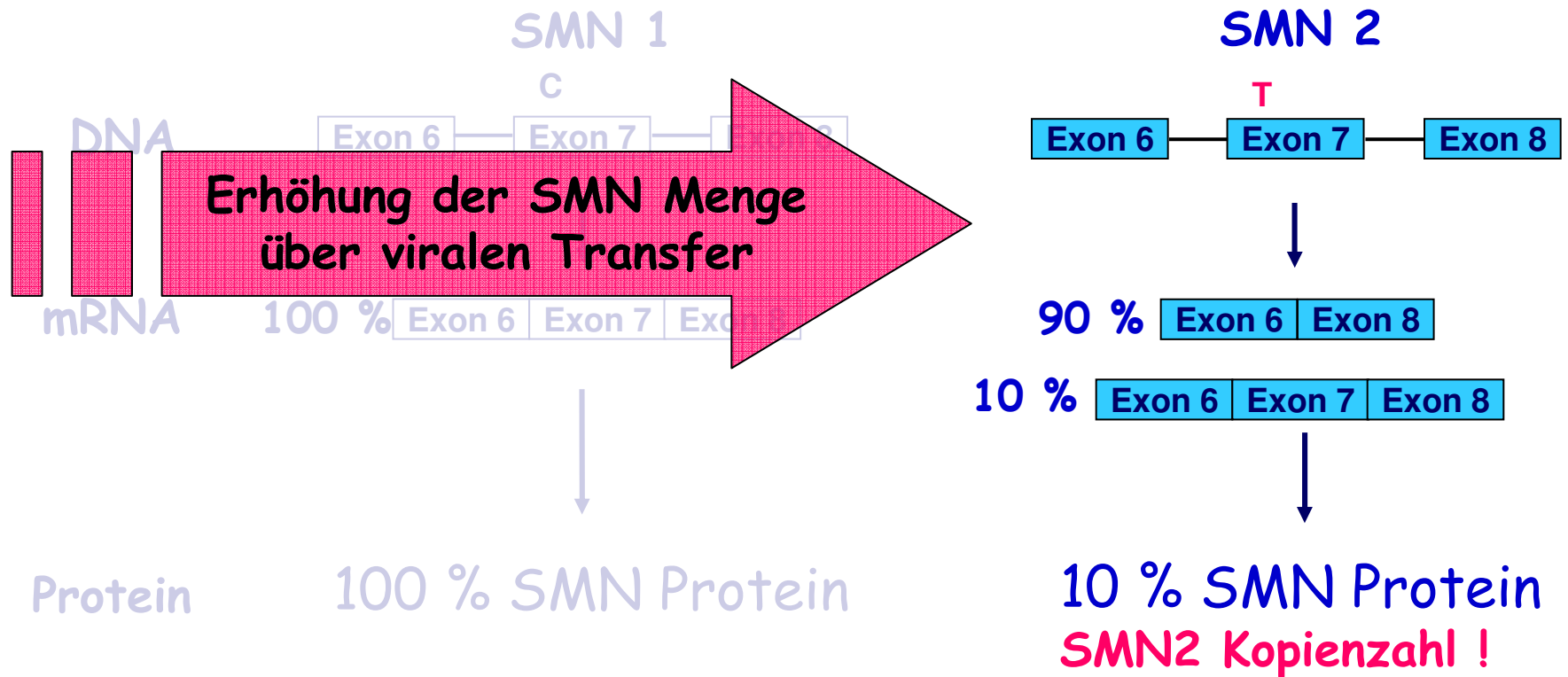
Meyer et al., 2009, HMG



Table 1 Overview of antisense oligonucleotide applications

<i>Mechanism</i>	<i>Application</i>	<i>Stage</i>	<i>References</i>
RNase H knockdown of DNA-RNA hybrids	Antiviral therapy Anticancer therapy	Registered drug phase III clinical trials	95,96
Immune activation through toll-like receptor 9	Anticancer therapy Vaccination adjuvant	Phase II clinical trials	97
Translation initiation/elongation block	Therapy (anticancer, antiviral, immune modulation, hypercholesterolemia) Developmental studies (mainly zebrafish)	Phase III trials	98,99
Splice modulation	Prevent cryptic splicing Modulate alternative splicing Restore open reading frame	Phase II clinical trials	7
Gene correction through mismatch repair mechanisms	Correct small mutations	Preclinical, low efficiency	100

1. Erhöhung der SMN Proteinmenge



SMN-Gendosis ↑



Azzouz et al., 2004, JCI

Applikation von Lentivektor-SMN in den Wadenmuskel, das Zwerchfell, den intercostal und Gesichtsmuskel und die Zunge.

Lentiviren werden retrograd in die Zellkörper der Motoneurone im Rückenmark transportiert, wo SMN translatiert wird.

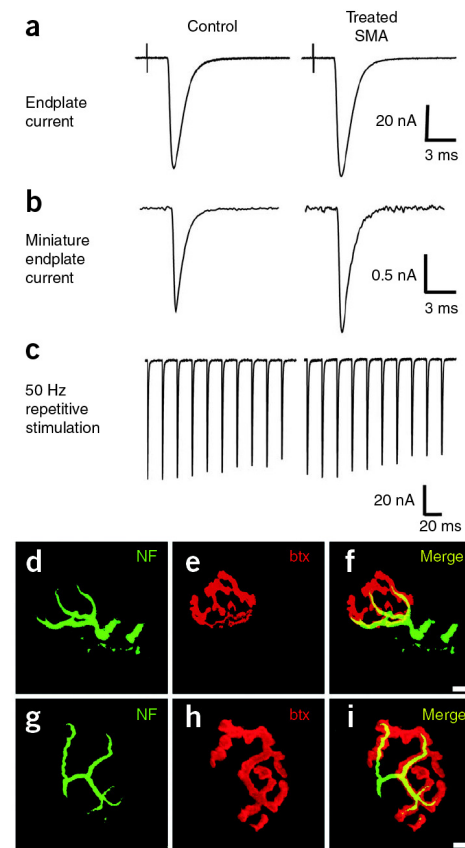
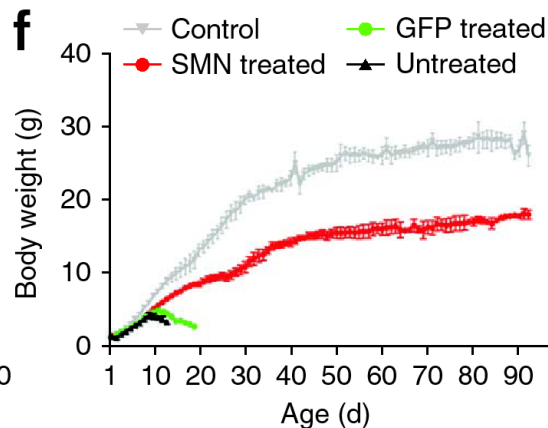
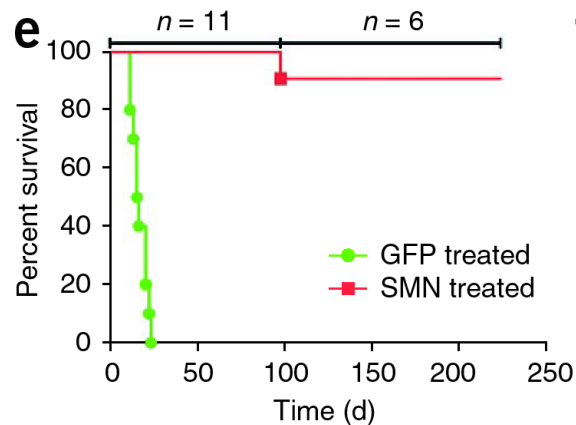
Die Mäuse zeigen eine erhöhte Überlebensrate von 2 bis 3 Tagen (Typ II SMA Mausmodell)

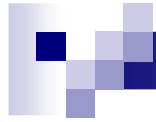
Foust et al., 2010, Nat Biotechnology

scAAV9-SMN vermittelter Gentransfer P1, intravenös

scAAV9-SMN passiert die Blut-Hirn-Schranke, 60% der Motoneurone werden infiziert

SMN Typ II Mäuse überleben bis zu 250 Tage im Gegensatz zu den unbehandelten Tieren (14 Tage)

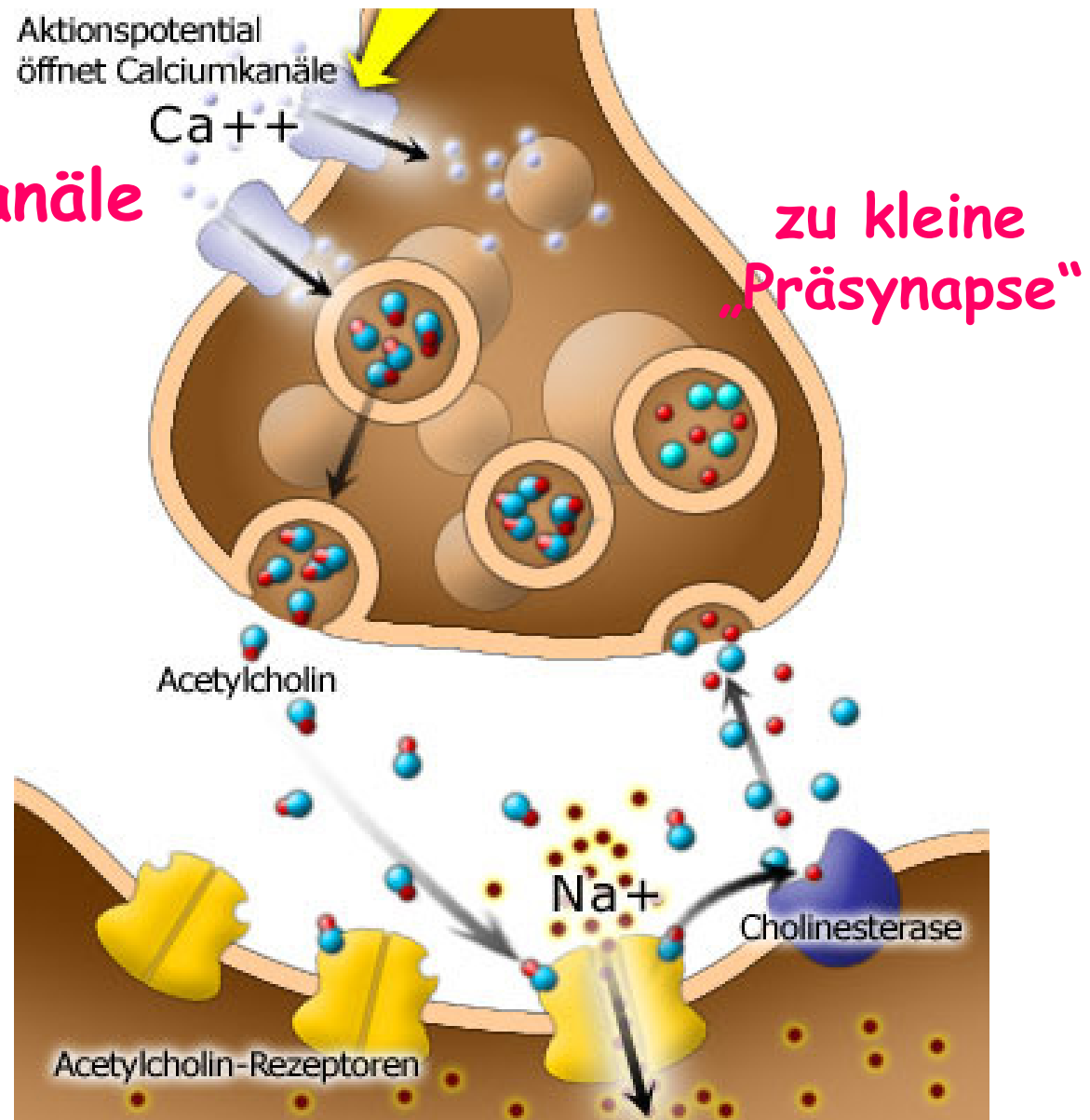




symptomatische Ansätze

z.B. Neurotrophe Faktoren

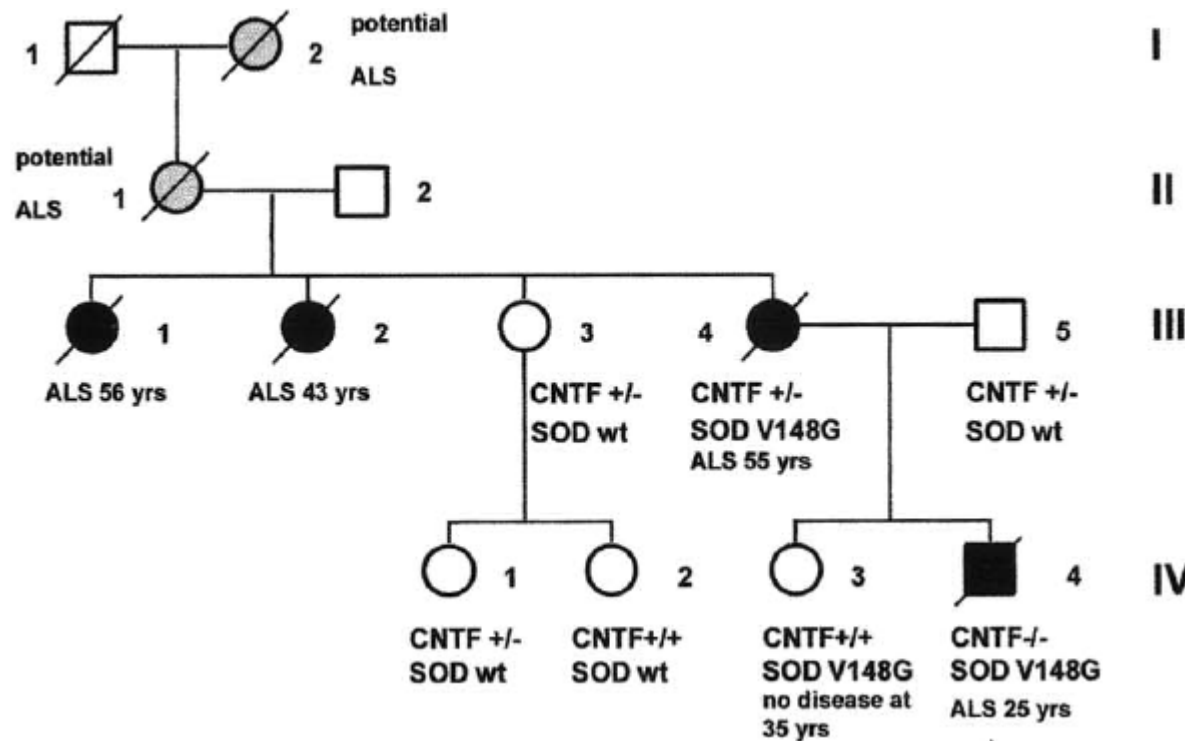
Kalziumkanäle



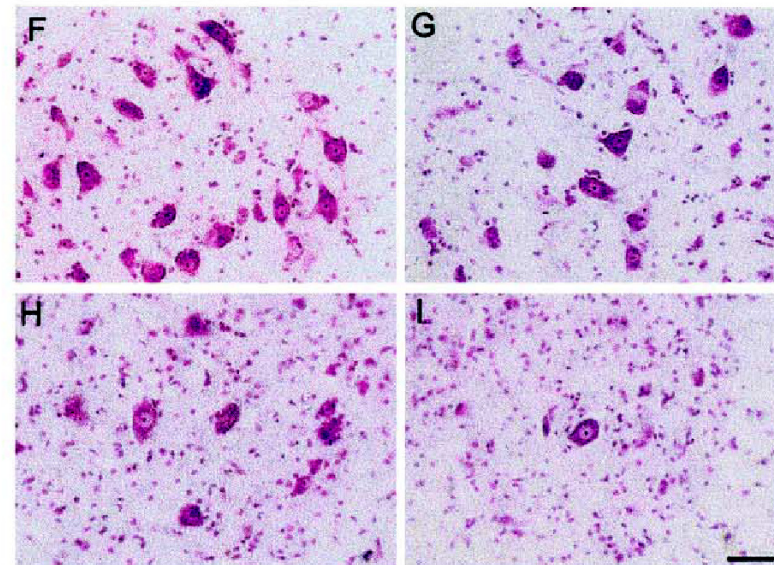
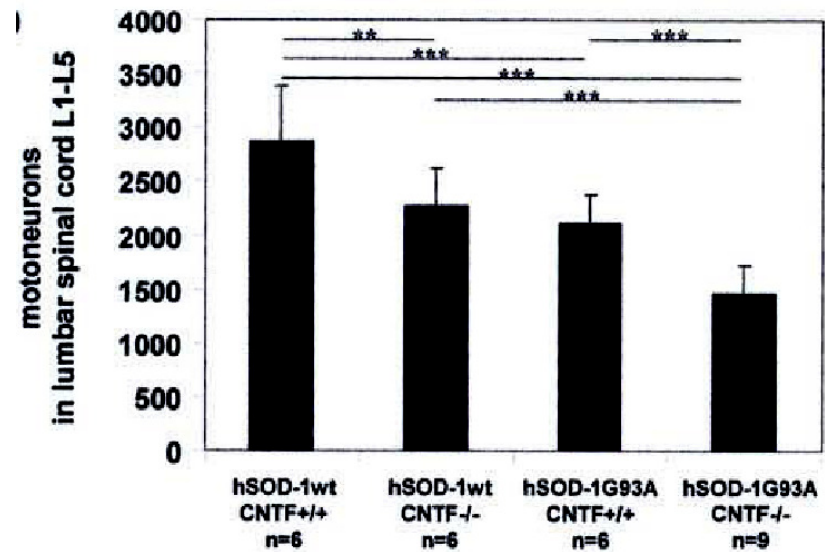
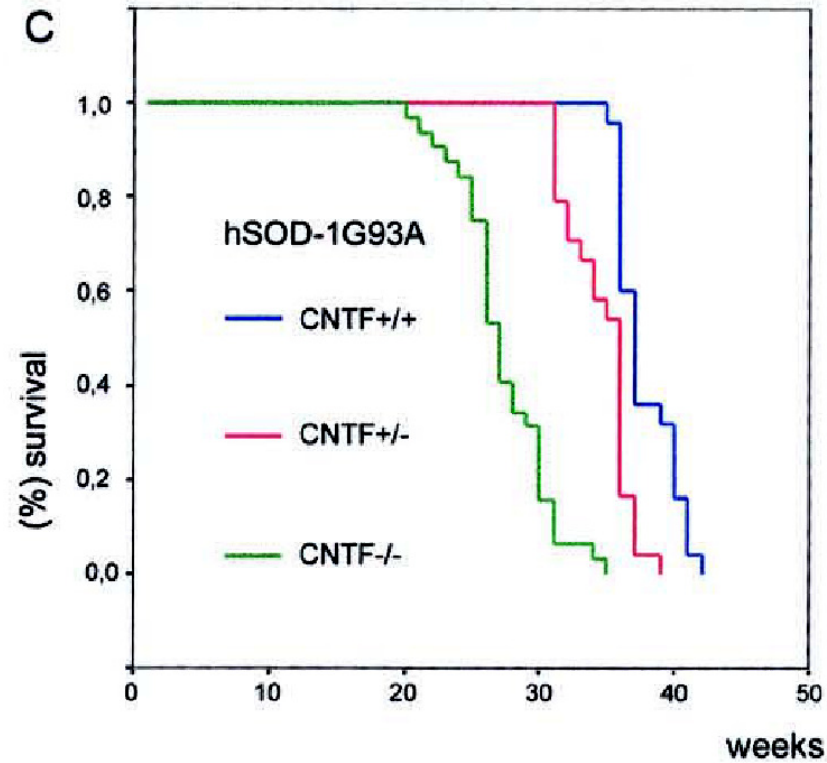
Early Onset of Severe Familial Amyotrophic Lateral Sclerosis with a *SOD-1* Mutation: Potential Impact of *CNTF* as a Candidate Modifier Gene

Ralf Giess,^{1,2} Bettina Holtmann,¹ Massimiliano Braga,^{1,*} Tiemo Grimm,³ Bertram Müller-Myhsok,⁴ Klaus V. Toyka,² and Michael Sendtner¹

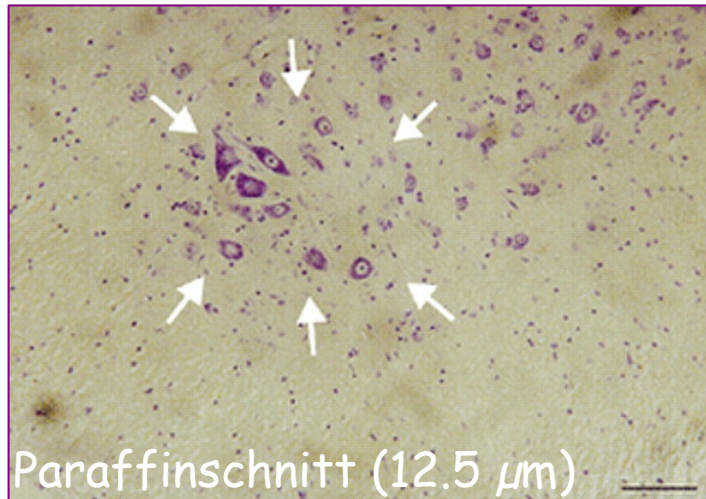
¹Institute for Clinical Neurobiology and Departments of ²Neurology and ³Human Genetics, University of Wuerzburg, and ⁴Laboratory of Bioinformatics, Bernhard Nocht Institute for Tropical Medicine, Hamburg



Giess et al., AJHG 2002

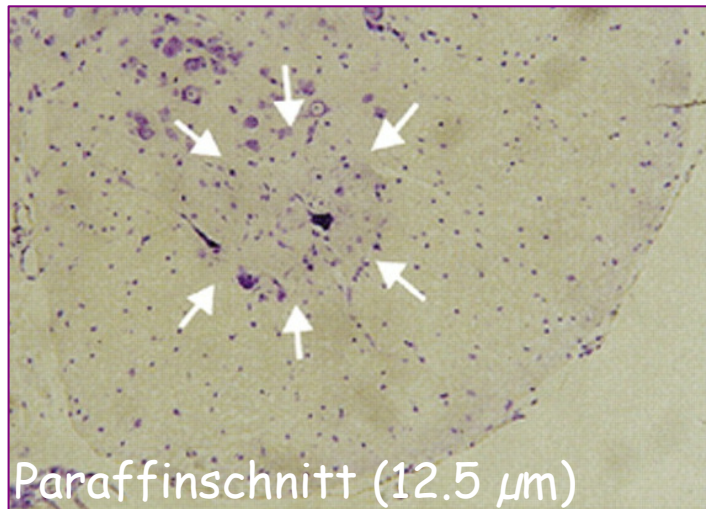


Smn^{+/+}



40% ige Reduktion der spinalen
Motoneurone bei einer 6 Monate alten
Smn^{+/-} Maus

Smn^{+/-}

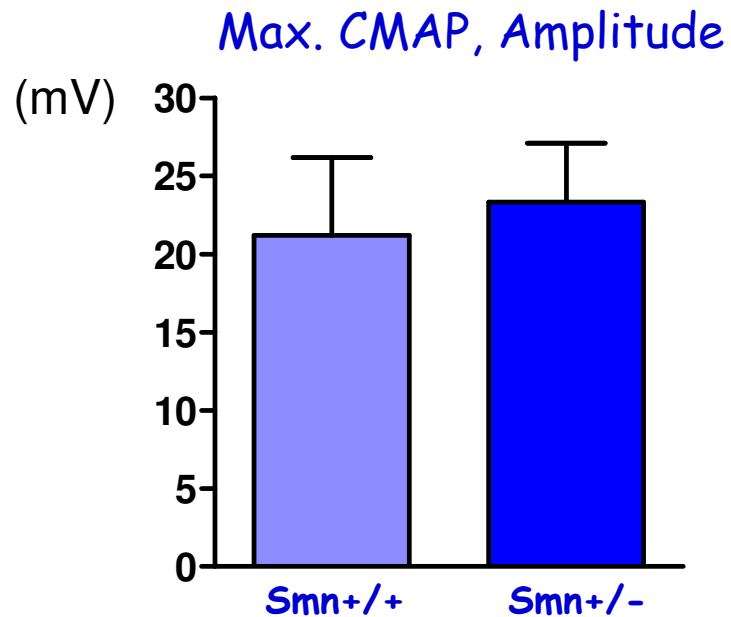


Motoneurondegeneration,
aber phänotypisch unauffällig

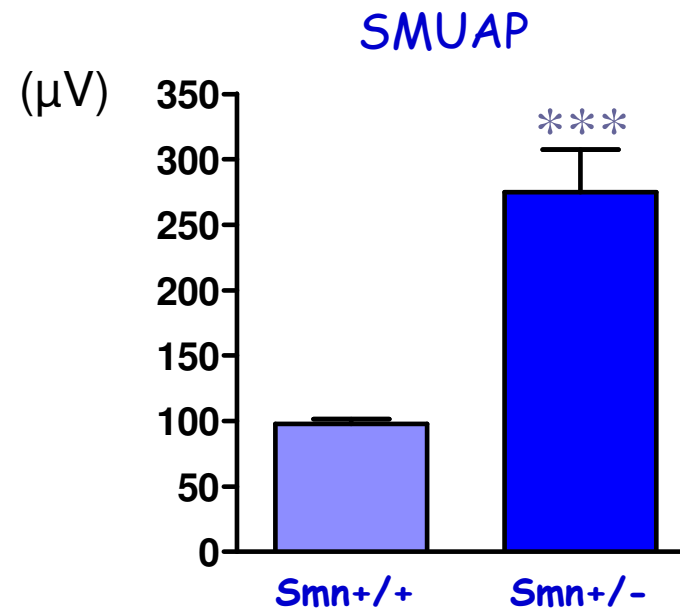
?

Kompensationsmechanismus

Jablonka et al., HMG 2000

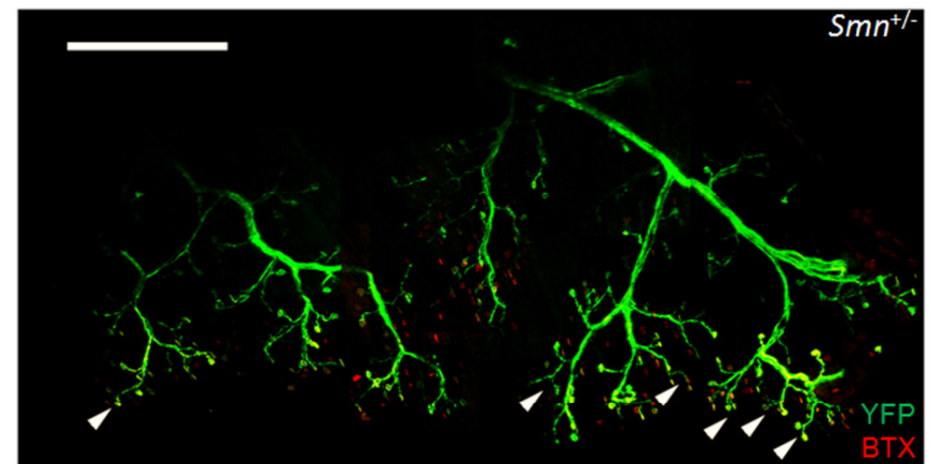
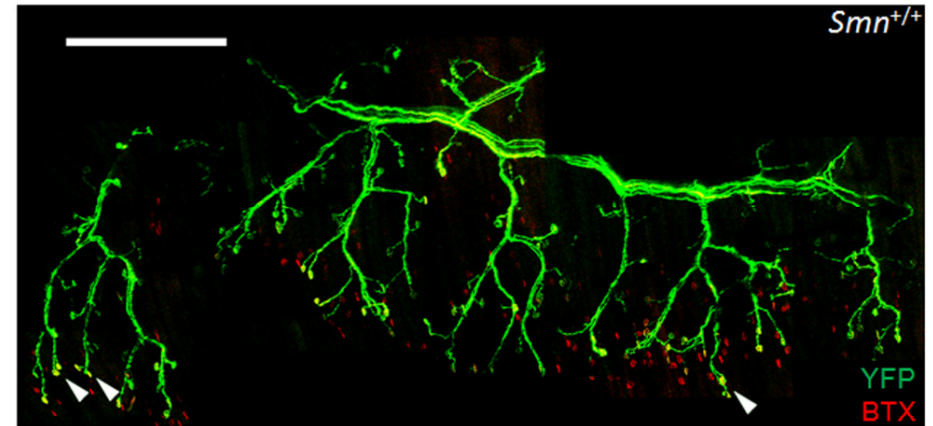
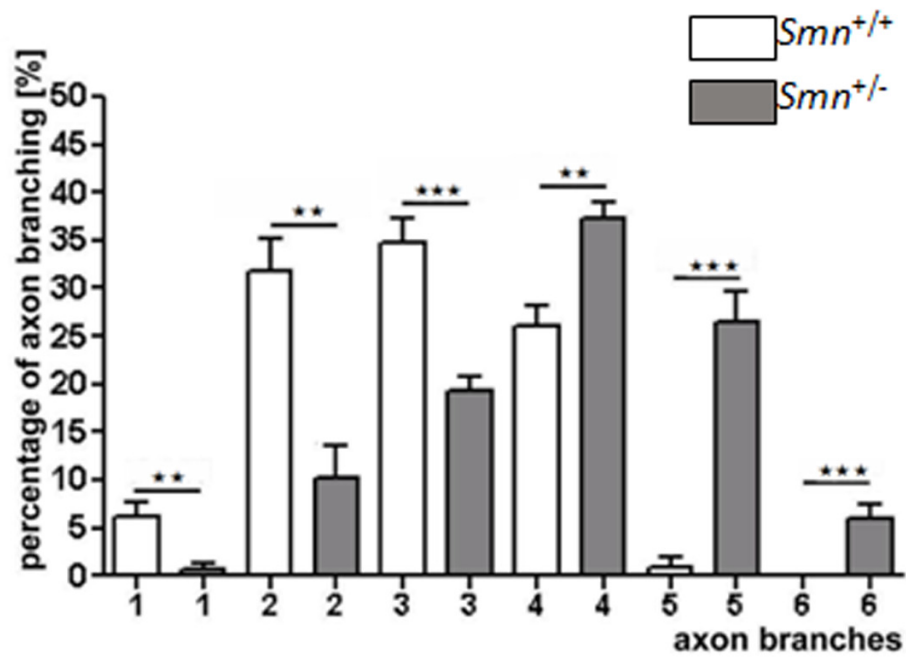
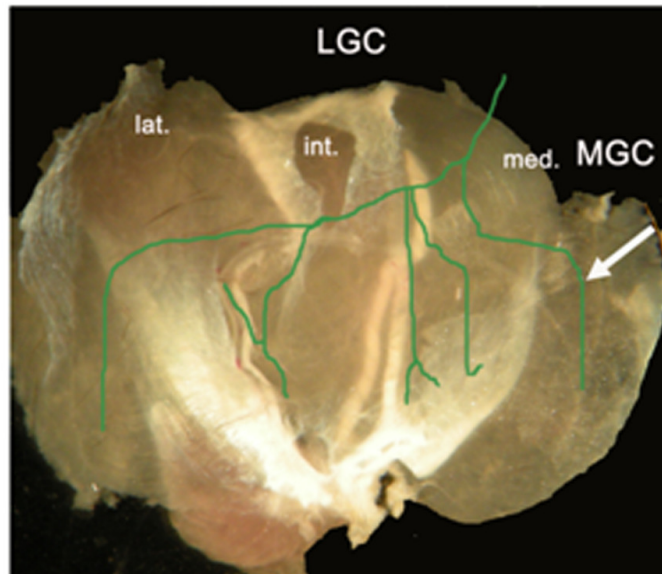


keine verminderte Muskelkraft

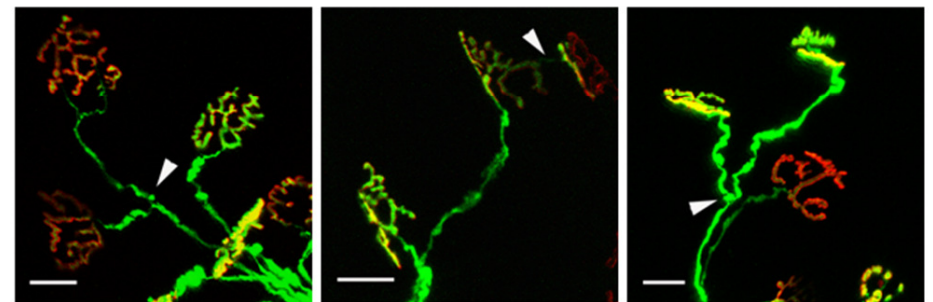


vergrößerte motorische Einheiten

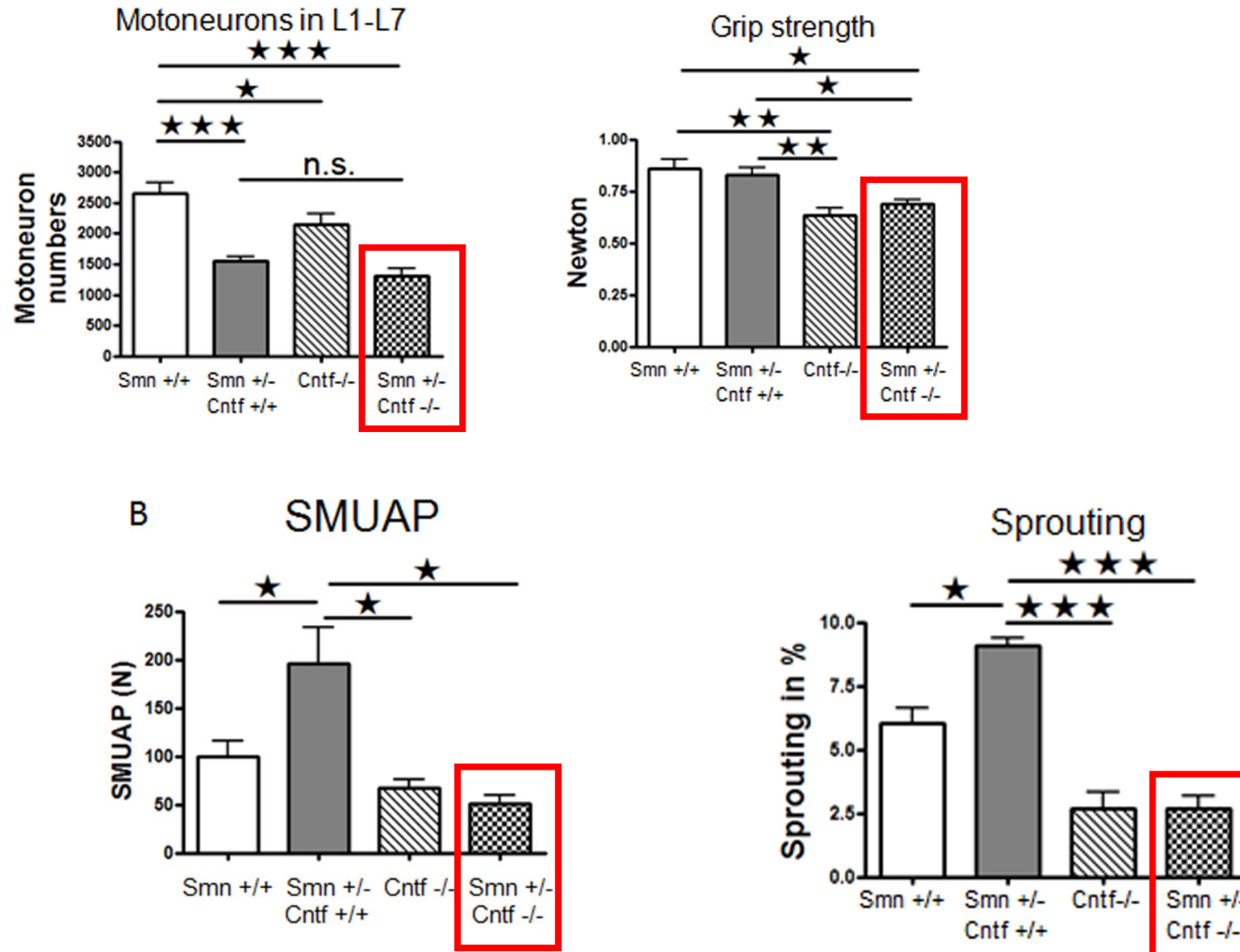
Axoniales Sprouting als kompensatorischer Mechanismus ???



D



CNTF induces axonal sprouting in a SMA mouse model



EINE THERAPIE FÜR SMA



Eine Initiative innerhalb des Fördervereins der DGM e.V.

Families of SMA, Libertyville, Illinois

ENDE

