



Varför just motorneuronen är så känsliga för en förlust av SMN1 är ännu inte känt och inte heller varför vissa motorneurongrupper är motståndskraftiga.

Forskare vid Karolinska Institutet har analyserat sjukdomsmekanismer i spinal muskelatrofi för att undersöka om och hur sårbara mänskliga motorneuron kan räddas från degeneration. **Eva Hedlund**, docent och forskningsledare, ger här en bakgrund till denna studie och diskuterar resultaten.

Kan man rädda motorneuron

I sjukdomen spinal muskelatrofi (SMA), som framför allt drabbar små barn under två års ålder, dör (degenererar) motorneuronen, de nervceller som kontrollerar alla våra viljestyrda muskler. Det finns dock grupper av motorneuron som är relativt okänsliga mot sjukdomen, speciellt de okulära motorneuronen i hjärnstammen vilka styr våra ögonmuskler och därmed att vi kan titta uppåt, nedåt och åt sidorna. SMA orsakas av en förlust av "survival motor neuron protein 1" (SMN1). SMN1-proteinet är nödvändigt för bland annat metabolism av ribonukleinsyra (RNA), budbärarmolekylerna av vår arvsmassa, och finns i alla celler i kroppen. Varför just motorneuronen är så känsliga för en förlust av SMN1 är ännu inte känt och inte heller varför vissa motorneurongrupper är motståndskraftiga.

SPINAL MUSKELATROFI – GENETISK ORSAK OCH GENTERAPI

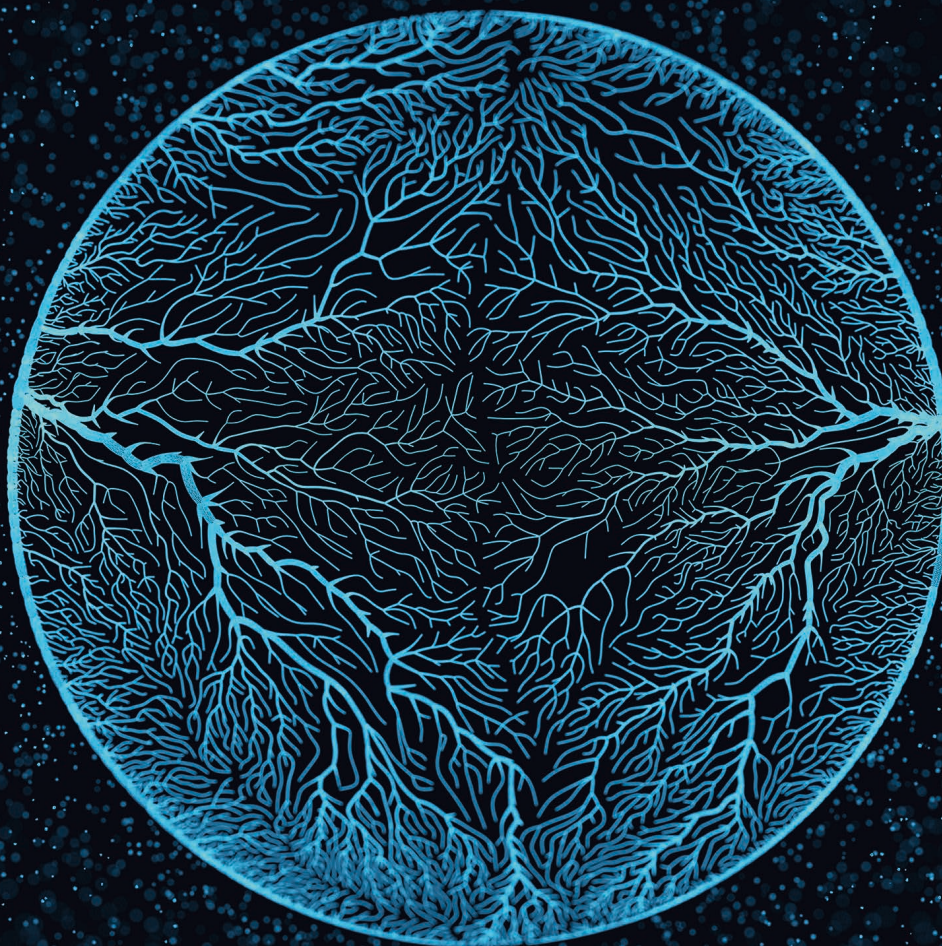
SMA är en monogenetisk sjukdom som orsakas av en förlust av SMN1-proteinet på grund av mutationer i SMN1-genen. Denna gen är aktiv i alla celler i kroppen men det är tydligt att vissa celler är speciellt känsliga för förlust av detta protein, såsom motorneuron vilka styr all vår skelettmuskulatur och vilka dör i SMA.

Människor har två SMN-gener, SMN1 och SMN2. SMN1-genen ger ett fullängdsprotein som är funktionellt och har viktiga funktioner i cellen. Framförallt är SMN1 involverat i metabolism av ribonukleinsyra (RNA), budbärarmolekylerna av vår arvsmassa, men SMN1 verkar också kunna motverka programmerad celldöd (så kallad apoptos) och förhindra att DNA-skada uppstår i cellen. SMN2-genen produce-

rar cirka 15–20 procent av funktionellt SMN1-protein (identiskt till det som resulterar från SMN1-genen) men genen resulterar mestadels (cirka 80–85 procent) i en ofullständig RNA-molekyl som översätts till ett trunkerat protein som är instabilt och inte funktionellt. Det finns fyra typer av SMA, Typ 1–4, med olika allvarlighetsgrad, där Typ 1 SMA är allvarligast och tidigare alltid ledde till paralis och död innan två års ålder.

Svårighetsgraden av sjukdomen regleras av hur många kopior individen har av SMN2-genen. Ju fler SMN2-genkopior, desto mildare sjukdom, då man från varje genkopia bildar 15–20 procent av det SMN1-protein man behöver.

Fram till för bara några få år sedan var Typ 1 SMA alltid dödlig, men så utvecklades äntligen terapier fokuserade på att öka mängden SMN1-protein.



från degeneration?



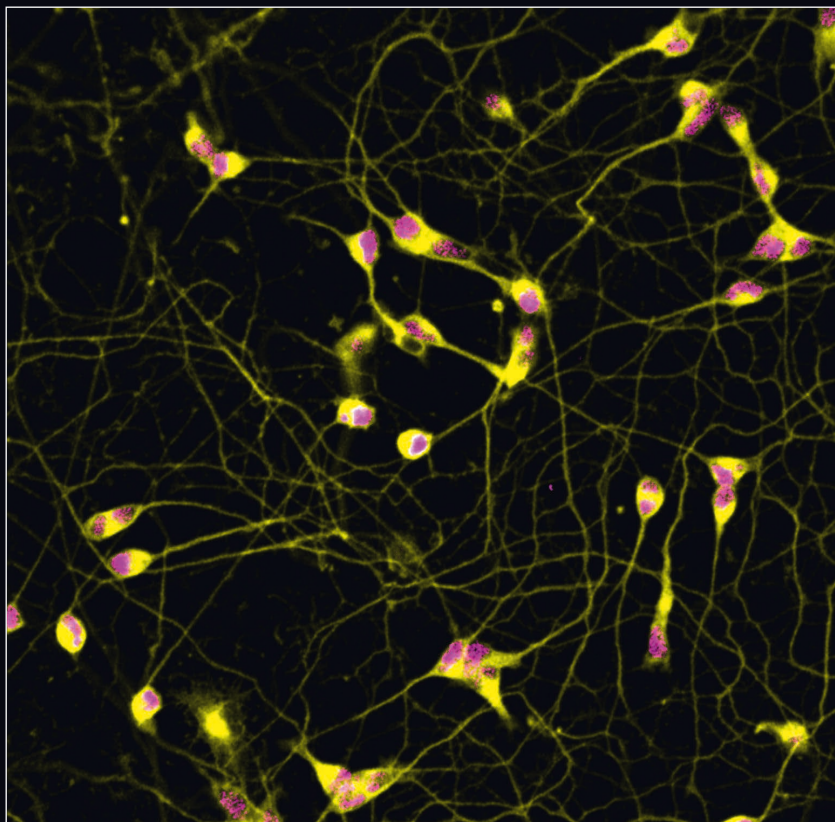
Fram till för bara några få år sedan var Typ 1 SMA alltid dödlig, men så utvecklades äntligen terapier fokuserade på att öka mängden SMN1 protein.

Spinraza eller Nusinersen, består av behandling (injektioner i ryggmärgsvätskan) av en liten DNA-bit (oligo) som förhindrar att SMN2-genen bildar en ofullständig RNA-molekyl och därmed ett ofullständigt protein och istället bildar en stor mängd funktionellt SMN1-protein.¹⁻³ Samtidigt utvecklades även en genterapistrategi för SMA, Zolgensma, där en frisk SMN1-genkopia ges till patienter via en engångsdos av virus bärandes på den mänskliga genen.⁴ De här

terapierna har inneburit att dödligheten i SMA minskat drastiskt och att patienterna nu kan botas. Dock kan de gynnsamma effekterna av terapierna variera något beroende på vid vilken tidpunkt under sjukdomsförloppet som behandlingen sätts in och sjukdomens svårighetsgrad och Zolgensma kan ibland orsaka akut leverskada. Det finns därför ett behov av kompletterande behandlingar som försöker bevara eller öka motorfunktion.

MOTORNEURONS OLIKA KÄNSLIGHET FÖR DEGENERATION

SMA karaktäriseras av en förlust av motorneuron, de nervceller som kontrollerar våra viljestyrda muskler. Vi förstår ännu inte varför just motorneuron är så känsliga för en förlust av SMN1-proteinet som ju finns i alla celler i kroppen. Vi förstår inte heller varför vissa grupper av motorneuron, såsom de okulära motorneuron (motorneuron i kranialnerv 3, 4 och 6) som styr vår ögonmuskulatur, är motståndskraftiga i SMA. Vi vet dock att en av huvuduppgifterna för SMN1 är att reglera metabolism av budbärar- (messenger) ribonukleinsyror (mRNA) i cellen, budbärarmolekylerna av vår arvs massa som visar vilka gener som är aktiva i cellen. mRNA-innehållet i en cell definierar cellernas unika identiteter och funktioner och påverkar även deras mottaglig-



Mänskliga motorneuron genererade från inducerade pluripotenta stamceller visualiserade genom färgning med antikroppar riktade mot nervcellsmarkören beta3-tubulin (gult) och motorneuron-markören Islet-1 (rosa). Foto: Dr Jik Nijssen.

Motståndskraftiga celler däremot påvisade generellt mycket tidiga svar på sjukdomen och verkar snabbt reglera mekanismer för att klara av förlusten av SMN1.

het för sjukdomar. Det finns flera studier som visar att det är faktorer inom själva motorneuronen som är avgörande för deras känslighet i SMA,⁵ men det är ännu okänt vad dessa är. Vi antog därmed att cellers inneboende egenskaper också styr deras motståndskraft mot sjukdomen.

Vi bestämde oss således för att göra en djupanalys av alla mRNA-molekyler inom celler som antingen påvisar stor motståndskraft eller känslighet i SMA för att se hur deras mRNA-innehåll ändras med förlust av SMN1 under sjukdomens gång och utvärdera om motståndskraftiga celler har ett RNA-svar/-innehåll som kan förklara varför de kan hantera sjukdomen.⁶

Vi använde oss av en musmodell av Typ 1 SMA,⁷ den mest allvarliga sjukdomsformen och analyserade celler vid tre olika tidpunkter under sjukdomsförloppet (presymtomatiskt, tidigt symtomatiskt och sent symtomatiskt). Vi studerade flera motståndskraftiga motorneuron, inklusive okulära motorneuron och hypoglossala motorneuron (vilka styr tungans muskler och vilken inte är påverkad i denna musmodell även om de ibland är påverkade hos patienter). Vi studerade också andra typer av nervceller som är motståndskraftiga i SMA bland annat autonoma motorneuron i vagusnerven (kranialnerv 10), som inte är viljestyrda, och nervceller i röda kärnan som är involverade i motorkoordi-

nation men som inte är motorneuron. Tanken bakom att studera olika typer av motståndskraftiga nervceller var för att undersöka om alla motståndskraftiga nervceller reagerar likadant på en förlust av SMN1 och om det alltså finns ett universellt svar som förklarar varför celler klarar sig bättre i denna sjukdom.

Vi analyserade även två olika grupper av känsliga motorneuron, facials motorneuron (kranialnerv 7) som styr ansiktsmuskulaturen och motorneuron i nedre ryggmärgen som styr muskulatur i bakbenen hos musen.

Nervcellerna isolerades från vävnad med hjälp av ett avancerat lasermikroskop genom så kallad laser capture microdissection⁸, LCM, och analyserades med RNA-sekvensering där miljontals mRNA-molekyler studeras vid varje tidpunkt och för varje cellgrupp. Detta är en metod som vi tidigare vidareutvecklat och som har hög känslighet för att detektera även mycket låga nivåer av RNA på en-cells-nivå.⁸ På detta sätt ville vi få en uppfattning om den dynamik som uppstår i celler när de svarar på en förlust av ett viktigt protein (SMN1) som vissa av cellerna verkar adaptera sig till medan andra slutar att fungera och dör. Vår hypotes var att motståndskraftiga motorneuron visar ett svar på SMN1-förlust som förklarar varför de överlever och vilket skulle kunna appliceras på känsliga celler för att stärka också deras motståndskraft mot sjukdomen.

Vår djupanalys visade att alla celler svarar på helt individuella sätt på förlusten av SMN1. Känsliga motorneuron var långsamma att svara på sjukdomen och när de väl visade respons så var det fokuserat på att svara på signaler om celldöd och DNA-skada. Motståndskraftiga celler däremot påvisade generellt mycket tidiga svar på sjukdomen och verkar snabbt reglera mekanismer för att klara av förlusten av SMN1. Dock reagerade ingen av celltyperna på samma sätt, så vi hittade inte en generell överlevnadsmekanism, utan mRNNSvaret verkar vara anpassat efter varje individuell celltyps behov.

Okulära motorneuron påvisade unika anpassningsmekanismer under sjukdomen och uppreglerade ett stort antal nervskyddande molekyler vilka verkar förklara deras motståndskraft i SMA. Bland annat ökade cellerna markant mängden av:

1) överlevnadsfaktorerna såsom CHL1 (cell adhesion molecule like-1), GDF15 (growth differentiation factor 15) och LIF (leukemia inhibitory factor);

cellerna. Detta betyder att vi kan identifiera faktorer som skyddar känsliga nervceller från degeneration genom att studera motståndskraftiga nervceller

Detta betyder att vi kan identifiera faktorer som skyddar känsliga nervceller från degeneration genom att studera motståndskraftiga nervceller och hur de svarar på sjukdom.

2) faktorer som blockerar oxidativ stress, såsom ALDH4A1 (Aldehyde Dehydrogenase 4 Family Member A1);

3) gener som blockerar programmerad celldöd, PAK4 (Serine/threonine-protein kinase 4)

4) faktorer som reglerar utväxt av motorneurons utskott (axoner) samt deras kontakt med muskel (synaps) såsom SYT1 (synaptotagmin 1), CPLX2 (complexin 2), CALDH1 (caldesmon) och GAP43 (growth associated protein 43).

Vår studie visade också att de okulära nervcellerna hade ett unikt svar vid varje sjukdomsstadium och därmed konstant verkar adaptera till den försvårade situationen.⁶ Vår studie visar tydligt att för att förstå sjukdomen behöver man studera alla relevanta celler och även analysera dessa longitudinellt för att förstå olika cellers anpassning. Om man enbart tittar på en celltyp förstår man inte vad som händer i dess grannar och inte heller vid ett annat stadium av sjukdomen. Det betyder också att det kan vara nödvändigt att behandla olika sjukdomsstadier på olika sätt terapeutiskt.

Slutligen testade vi om en faktor, GDF-15, som vi identifierat i motståndskraftiga okulära motorneuron, kunde rädda känsliga ryggmärgsmotorneuron från degeneration. Vi derivade motorneuron från mänskliga inducerade pluripotenta stamceller och odlade dem under förhållanden där cellerna långsamt börjar att dö. Vi kunde här visa att tillsats av GDF15 räddade

och hur de svarar på sjukdom. Vi hoppas nu att de faktorer vi identifierat i okulära motorneuron, inklusive GDF15, som verkar fungera som ett försvar mot sjukdomen, i framtiden kan användas som kompletterande behandlingar för SMA-patienter för att bevara känsliga motorneuron.

Studien har finansierats av Vetenskapsrådet, European Union Joint Programme for Neurodegenerative Disease (JPND), Swiss National Science Foundation och Karolinska Institutet.



Foto: Karl Gabor

EVA HEDLUND
Docent, Institutionen för Cell och Molekylär Biologi, Karolinska Institutet
eva.hedlund@ki.se

Universitetslektor vid Institutionen för Biokemi och Biofysik, Stockholms Universitet
eva.hedlund@dbb.su.se

REFERENSER

1. Chiriboga CA, Swoboda KJ, Darras BT, Iannaccone ST, Montes J, De Vivo DC, Norris DA, Bennett CF, Bishop KM. Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN(Rx)) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* 2016; 86(19):890-897.

2. Finkel RS, Chiriboga CA, Vajsar J, Day JW, Montes J, De Vivo DC, Yamashita M, Rigo F, Hung G, Schneider E, Norris DA, Xia S, Bennett CF, Bishop KM. Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 2016; 388(10063):3017-3026.

3. Finkel RS, Mercuri E, Darras BT, Connolly AM, Kuntz NL, Kirschner J, Chiriboga CA, Saito K, Servais L, Tizzano E, Topaloglu H, Tulinius M, Montes J, Glanzman AM, Bishop K, Zhong ZJ, Gheuens S, Bennett CF, Schneider E, Farwell W, De Vivo DC, ENDEAR Study Group. Nusinersen versus Sham control in infantile-onset spinal muscular atrophy. *New England Journal of Medicine* 2017; 377(18):1723-1732.

4. Mendell JR, Al-Zaidy S, Shell R, Arnold WD, Rodino-Klapac LR, Prior TW, Lowes L, Alfano L, Berry K, Church K, Kissel JT, Nagegdran S, L'Italien J, Sproule DM, Wells C, Cardenas JA, Heitzer MD, Kaspar A, Corcoran S, Braun L, Likhite S, Miranda C, Meyer K, Foust KD, Burges AHM, Kaspar BK. A single-dose gene-replacement therapy for spinal muscular atrophy. *New England Journal of Medicine* 2017; 377(18):1713-1722.

5. Corti S, Nizzardo M, Simone C, Falcone M, Nardini M, Ronchi D, Donadoni C, Salani S, Riboldi G, Magri F, Menozzi G, Bonaglia C, Rizzo F, Bresolin N, Comi GP. Genetic correction of human induced pluripotent stem cells from patients with spinal muscular atrophy. *Science Translational Medicine* 2012; 4(164):165ra162.

6. Nichterwitz S, Nijssen J, Storvall H, Schweingruber C, Comley LH, Allodi I, van der Lee M, Deng Q, Sandberg R and Hedlund E. LCM-seq reveals unique transcriptional adaptation mechanisms and protective pathways of resistant neurons in spinal muscular atrophy. *Genome Research* 2020; 30:1083-1096.

7. Le TT, Pham LT, Butchbach MER, Zhang HL, Monani UR, Coover DD, Gavrilina TO, Xing L, Bassell GJ, Burghes AHM. SMN 7, the major product of the centromeric survival motor neuron (SMN2) gene, extends survival in mice with spinal muscular atrophy and associates with fulllength SMN. *Human Molecular Genetics* 2005; 14:845-857.

8. Nichterwitz S, Chen G, Aguila Benitez J, Storvall H, Yilmaz M, Cao M, Sandberg R, Deng Q and Hedlund E. Laser-capture microscopy coupled with Smart-seq2 (LCM-seq) for precise spatial transcriptome profiling. *Nature Communications* 2016; 7:12139