Molekularne podłoże i terapia rdzeniowego zaniku mięśni

Molecular basis and therapy of spinal muscular atrophy

Anna Szczerba¹ , Aleksandra Śliwa¹ , Marcin Żarowski² , Anna Jankowska¹

¹ Katedra i Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; ul. Rokietnicka 5D, Poznań

² Katedra i Klinika Neurologii Wieku Rozwojowego, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; ul. Przybyszewskiego 49, Poznań

DOI:10.20966/chn.2018.55.429

STRESZCZENIE

Rdzeniowy zanik mięśni, SMA (spinal muscular atrophy) to genetyczna choroba powodowana mutacją genu *SMN1* i w konsekwencji niedoborem białka SMN (survival of motor neuron), które odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów w motoneuronach. Jego brak prowadzi do zwyrodnienia i apoptozy komórek rogów przednich rdzenia kręgowego i w konsekwencji zaniku mięśni. Gen *SMN* w ludzkim genomie występuje w co najmniej dwóch kopiach: *SMN1* i *SMN2*. Oba geny kodują identyczne białko, jednak transkrypty *SMN1* mają pełną długość (FL-SMN), a 90% transkryptów *SMN2* jest pozbawiona eksonu 7 (SMN-Δ7), co powoduje niefunkcjonalność białka. FL-SMN jest niezbędne do prawidłowego przeprowadzenia procesu splicingu. Niskie stężenie białka SMN upośledza także dynamikę szkieletu aktynowego, co skutkuje zahamowaniem wzrostu aksonów motoneuronów.

Dotychczasowe leczenie SMA opierało się głównie na działaniach neuroprotekcyjnych i wzmacniających siłę mięśni. Obecnie, dzięki wykorzystaniu antysensownych nukleotydów (ASO), możliwa jest terapia modulująca przebieg splicingu, która pozwala na włączenie eksonu 7 do transkryptu *SMN2*. Takim ASO jest nusinersen, który został zatwierdzony do użytku w USA i Europie; jest on w pełni refundowany w Polsce. Terapeutyk jest przeznaczony do leczenia pacjentów ze wszystkimi typami SMA w każdym wieku. Inną strategią leczenia jest terapia genowa pod nazwą onasemnogene AOPAV (AVXS-101), polegająca na wprowadzeniu do organizmu pacjenta prawidłowej kopii genu *SMN1*. Nośnikiem genu terapeutycznego, wnikać jedynie do komórek układu nerwowego, jest wektor wirusowy AAV. Lek ten został zatwierdzony przez FDA w leczeniu SMA pacjentów poniżej 2. roku życia.

Słowa kluczowe: rdzeniowy zanik mięśni, gen *SMN*, białko SMN, antysensowne oligonukleotydy, nusinersen, terapia genowa, AVXS-101

ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is a genetic disorder caused by mutations in the *SMN1* gene and, consequently, a deficiency of the SMN (survival of motor neuron) protein, which plays a key role in regulating gene expression in motoneurons. Its absence leads to degeneration and apoptosis of the anterior horn cells of the spinal cord and, as a consequence, to muscular atrophy. In the human genome the *SMN* gene is found in at least two copies: *SMN1* and *SMN2*. Both genes encode the same protein, however, *SMN1* transcripts are full-length (FL-SMN) and 90% of *SMN2* transcripts are deprived of exon 7 (SMN-Δ7), which causes the protein to be non-functional. FL-SMN is necessary for proper splicing process. Low concentration of the SMN protein also impairs the dynamics of the actin skeleton, which results in inhibition of motoneuron axon growth.

Hitherto SMA treatment was based mainly on neuroprotective and muscle strength enhancing approaches. Currently, thanks to the use of antisense nucleotides (ASO), it is possible to modulate the splicing process of *SMN2*, which allows the incorporation of exon 7 into the *SMN2* transcripts. Nusinersen is an ASO that has been approved for clinical use in USA and Europe; it is fully refunded in Poland. The therapy is intended for the treatment of patients with all types of SMA at all ages.

Another treatment strategy is the gene therapy called onasemnogene AOPAV (AVXS-101) which allows introducing the correct copy of the *SMN1* gene into the patient's body. The carrier of the therapeutic gene that enters only the cells of the nervous system is an AAV viral vector. This drug has been approved by the FDA for the treatment of SMA in patients under 2 years of age.

Keywords: spinal muscular atrophy, *SMN* gene, SMN protein, antisense oligonucleotides Spinraza, gene therapy, Zolgensma

Termin „rdzeniowy zanik mięśni” – SMA (spinal muscular atrophy) dotyczy grupy zaburzeń genetycznych, z których wszystkie charakteryzują się zwyrodnieniem komórek rogu przedniego rdzenia kręgowego i wynikającym z niego osłabieniem i zanikiem mięśni.

SMA charakteryzuje duża zmienność nasilenia objawów. W zależności od wieku pojawienia się pierwszych symptomów i możliwości osiągnięcia kamieni milowych rozwoju motorycznego jak samodzielne siedzenie, stanie i chodzenie, rdzeniowy zanik mięśni został podzielony na cztery typy kliniczne: typ 1 – najcięższy; objawia się do szóstego

miesiąca życia; niemowlęta nigdy nie osiągają zdolności samodzielnego siedzenia, umierają zwykle przed ukończeniem 2. roku życia z powodu problemów oddechowych [1]; typ 2 pośredni – choroba rozwija się między 7. a 18. miesiącem życia; dzieci zwykle są w stanie siadać, ale nie stają samodzielnie; typ 3 łagodny – pacjenci są w stanie stać a nawet chodzić; dożywają dorosłości [2] oraz typ 4 – występuje u dorosłych i ma najłagodniejszy przebieg [3,4]. Choroba najczęściej jest spowodowana niedoborem białka SMN (survival of motor neuron), które odgrywa kluczową rolę w regulacji ekspresji genów w neuronach ruchowych.

Brak SMN prowadzi do zwyrodnienia i apoptozy komórek rogów przednich rdzenia kręgowego i w konsekwencji zaniku mięśni unerwianych przez te motoneurony [5].

W ponad 95% przypadków niedobór białka SMN wynika z mutacji kodującego go genu – *SMN1*, przede wszystkim delecji (90%), rearanżacji (5%) lub innych mutacji. SMA dziedziczy się w sposób autosomalny recesywny. Badania obejmujące populacje różnego pochodzenia etnicznego wykazały, że choroba pojawia się średnio z częstotliwością około ośmiu przypadków na 100 000 żywych urodzeń (~ 1 na 12 000). Niektóre badania wykazują nieco niższą lub wyższą zapadalność w różnych populacjach; szacuje się, że jedna na 54 osoby jest nosicielem zmutowanego genu [6,7]. U ponad 98% pacjentów cierpiących na rdzeniowy zanik mięśni zmutowane są obie kopie genu *SMN1* [5,8]. Każdy z pacjentów zachowuje jednak co najmniej jedną kopię niemal identycznego genu *SMN2*. Ponieważ obecność niezmutowanych genów *SMN2* pozwala na powstanie niewielkiej ilości białka SMN o prawidłowej budowie, geny te częściowo kompensują niefunkcjonalny gen *SMN1* [9].

GENY *SMN*

Gen *SMN* w ludzkim genomie występuje w co najmniej dwóch kopiach: *SMN1* (*SMNT*, telomerowy) i *SMN2* (*SMNC*, centromerowy). Obie kopie zbudowane są z dziewięciu eksonów i ośmiu intronów, które obejmują około 20 tysięcy par zasad. Geny cechuje wysoki procent homologii – 99%. Ich sekwencja różni się jedynie pięcioma nukleotydami, z których tylko jeden znajduje się w regionie kodującym. Żaden z nich nie wpływa na sekwencję aminokwasową białka powstającego na ich matrycy [5,10].

Oba geny kodują identyczne białko. Jednak o ile większość transkryptów genu *SMN1* ma pełną długość (full length-SMN, FL-SMN), to przeważającą część transkryptów (90%) *SMN2* stanowi tzw. alternatywną formę splicingową, pozbawioną eksonu 7 ($\Delta 7$ -SMN). Jego brak spowodowany jest alternatywnym składaniem eksonów w trakcie splicingu, czyli wycinania intronów z pre-mRNA. Pominięcie siódmego eksonu i powstanie skróconego produktu wynika ze zmiany – tranzykcji nukleotydu cytozyny w tyminę w eksonie 7 genu *SMN2* [11].

Transkrypty $\Delta 7$ -SMN kodują białko pozbawione eksonu 7, które jest niezdolne do oligomeryzacji, niestabilne i szybko ulega degradacji [12].

Jedynie ok. 10% dojrzałego mRNA powstającego na matrycy *SMN2* zawiera siódmy ekson, co prowadzi do powstania SMN o pełnej długości – FL-SMN. Ten niski poziom białka jest dostateczny, by zapewnić przeżycie w okresie prenatalnym, jednak niewystarczający, by zapobiec utracie neuronów ruchowych w okresie niemowlęcym (typ I SMA) lub dzieciństwie (typ II i III SMA) [13].

Uważa się, że kliniczny przebieg rdzeniowego zaniku mięśni w znacznej mierze zależy od liczby kopii genów *SMN2*. Ponad 90% pacjentów cierpiących na typ 1 SMA posiada jedną lub dwie kopie *SMN2*. Ponad 85% pacjentów z SMA typu 2 ma trzy kopie tego genu. Natomiast, u około 85% pacjentów cierpiących na SMA typu 3 i 4 występują trzy lub cztery kopie *SMN2* [14]. W ten sposób, mimo że nie ma bezpośredniej korelacji między liczbą

kopii *SMN2* a postacią choroby, analiza liczby kopii tego genu w niektórych przypadkach pozwala ustalić rokowania dla pacjenta. Należy mieć na uwadze, że w literaturze opisano różnice fenotypowe u rodzeństw identycznych pod względem liczby kopii *SMN2* i ze zmutowanym genem *SMN1* [15]. Wykazano również, że utrata genu *SMN2*, przy prawidłowym funkcjonowaniu *SMN1*, nie prowadzi do zmiany fenotypu [16].

ALTERANTYWNY SPLICING GENÓW *SMN*

Zachodzący w komórkach eukariotycznych proces splicingu, zwany także składaniem genów, umożliwia usunięcie sekwencji niekodujących – intronów z prekursorowego mRNA (pre-mRNA) syntetyzowanego w procesie transkrypcji. Powstałe po połączeniu eksonów (sekwencji kodujących) cząsteczki mRNA stanowią matryce do produkcji białka.

Jak wspomniano, badania nad molekularnym podłożem SMA wykazały, że to mutacja genu *SMN1* i alternatywny splicing genu *SMN2* prowadzą do niedoboru białka SMN regulującego funkcję neuronów ruchowych [17].

Analizy składania genów *SMN* wykazały, że w sekwencji genu *SMN1* znajduje się odcinek nazywany eksonowym wzmacniaczem procesu splicingu (ang. exonic splicing enhancer, ESE). Odcinek ten znajduje się centralnie w siódmym eksonie i zawiera cytozynę w pozycji szóstej (Ex7 + 6). Obecny w sekwencji genu *SMN1* wzmacniacz splicingu ESE jest rozpoznawany przez czynnik SF2/ASF (ang. alternative splicing factor 1, ASF1; pre-mRNA-splicing factor, SF2), który oddziałuje z rybonukleoproteiną U2 (U2 snRNP) w celu utworzenia spliceosomu i usunięcia szóstego intronu [18].

Zamiana cytozyny w pozycji szóstej (Ex7 + 6) genu *SMN1* na tyminę w genie *SMN2* skutkuje wprowadzeniem do transkryptu *SMN2* rybonukleotydu komplementarnego do tyminy – urydyny. Czynnik SF2/ASF nie rozpoznaje motywu sekwencji z urydyną. Motyw ten wiąże inny czynnik – heterogenną jądrową rybonukleoproteinę A1 (hnRNP A1), która działa jak inhibitor splicingu. Oddziaływanie hnRNP A1 z transkrypcją *SMN2* uniemożliwia wiązanie U2 snRNP, co powoduje, że około 90% dojrzałych transkryptów mRNA *SMN2* jest pozbawionych sekwencji kodowanej przez siódmy ekson. Ponieważ wciąż działają inne czynniki splicingowe (takie jak: SR, Tra2), możliwe jest włączenie eksonu 7 do około 10% transkryptów *SMN2* [19].

Inne izoformy splicingowe SMN zostały odkryte w hodowlach komórkowych zarówno w warunkach stresowych, jak i fizjologicznych; ich rola *in vivo* nie została jeszcze określona. Obejmują one izoformy z wyłączeniem eksonów 3, 4 i 5 lub kilku z nich [20,21]. Pomijanie wewnętrznych eksonów SMN nie zmienia ramki odczytu.

BIAŁKO SMN I JEGO ROLA W KOMÓRCE

SMN to białko wysoce konserwatywne. Jego obecność stwierdzono już u drożdży, przy czym jeden z kodujących go genów – *SMN2* jest unikalny dla człowieka [22].

SMN ulega ekspresji we wszystkich typach ludzkich komórek somatycznych [23–25]. Szczególnie duża ilość

SMN jest syntetyzowana w neuronach ruchowych rdzenia kręgowego [26,27].

Białko SMN to cząsteczka o masie 38 kD. Badania *in vitro* dowiodły, że większość SMN ma zdolność do oligomeryzacji i tworzy złożone struktury przestrzenne, przede wszystkim oktamer [28,29]. Dokładna liczba monomerów SMN w kompleksie nie jest jeszcze znana; nie wiadomo również, czy oligomeryzacja zależy od stężenia białka SMN [30].

SMN lokalizuje się w cytoplazmie i na terenie jądra komórkowego [31]. W jądrze komórkowym SMN występuje w obrębie małych struktur zwanych ciałkami Cajala [32]; ich występowanie cechuje komórki o wysokiej aktywności metabolicznej, takie jak neurony czy komórki nowotworowe [33].

Funkcja białka SMN nie jest do końca poznana. Liczne badania pokazują, że SMN cechuje zdolność interakcji z wieloma białkami, zaangażowanymi w różne funkcje komórkowe, co sugeruje, że SMN tworząc kompleksy z innymi białkami może być zaangażowane w szereg procesów komórkowych. Najlepiej poznana jest rola SMN w procesie splicingu.

Ciałka Cajala są miejscem początkowej modyfikacji i montażu niektórych małych jądrowych, bogatych w urydynam nukleoprotein – U snRNP, biorących udział w dojrzewaniu pre-mRNA [34]. U snRNP są głównymi składnikami spliceosomów rozpoznających wysoce konserwowane sekwencje miejsc wycinania intronów. SMN funkcjonuje tu jako część złożonego (co najmniej osiem różnych białek), wysoce stabilnego kompleksu, odgrywającego istotną rolę w biogenezie snRNA [35]. Białko SMN jest niezbędne do prawidłowego złożenia U snRNP [36,37].

Proces składania snRNP jest bardzo intensywny podczas rozwoju zarodkowego i w okresie wczesnoniemowlęcym; maleje po różnicowaniu miogenicznym i neuronalnym [38]. W okresie życia płodowego dochodzi do uruchomienia całych sieci transkrypcyjnych, obejmujących wiele genów regulujących dynamikę komórkową [39]. Aby przeprowadzać proces dojrzewania dużej liczby cząsteczek pre-mRNA, potrzeba dużych ilości snRNP. Mutacje w genie *SMN1*, a w konsekwencji brak białka SMN o prawidłowej budowie, hamuje biogenezę snRNP, co może prowadzić do zwyrodnienia neuronów ruchowych obserwowanego u pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni. Hipotezę tę wydaje się potwierdzać fakt, że nasilenie objawów SMA koreluje ze zmniejszoną oligomeryzacją cząsteczek zmutowanego białka SMN, która warunkuje tworzenie dalszych kompleksów, w tym tych zaangażowanych w składanie snRNP [28].

Białko SMN tworzy także rybonukleoproteinowe kompleksy RNP zaangażowane w aksonalny transport cząsteczek RNA [40]. Nieprawidłowe dojrzewanie RNA i wadliwy transport wewnątrzkomórkowy wydają się być uniwersalną częścią patomechanizmu chorób neuronu ruchowego. Potwierdzają to wyniki badań zaburzeń leżących u podstaw nie tylko rdzeniowego zaniku mięśni ale także stwardnienia zanikowego bocznego (ALS) [41,42].

Białko SMN zlokalizowano również w unikalnym kompleksie aksonalnym z heterogennymi jądrowymi rybo-

nukleoproteinami Q i R (hnRNPQ/R) [43,44]. Kompleks SMN-hnRNPQ/R wpływa m.in. na transport β -aktyny [45]. Badania prowadzone *in vitro* [46] i na zwierzęcym modelu SMA [47] dowiodły, iż niskie stężenie białka SMN obniża ilość β -aktyny (zarówno mRNA jak i białka) w aksonach i ich stożkach wzrostu. Niedobór β -aktyny powoduje z kolei zahamowanie wzrostu neurytów motoneuronów, a zatem niemożność tworzenia synaps nerwowo-mięśniowych [45].

Kolejnym partnerem białkowym SMN jest profilina Ila. Ta forma profiliny, dominująca w komórkach nerwowych, wiąże aktynę i kontroluje przebudowę filamentów aktynowych. Aktywność ta warunkuje ruch komórek, zmiany ich kształtu, w tym dynamikę szkieletu aktynowego w kielkujących neurytach i ich stożkach wzrostu [48]. Wykazano, że genetyczny nokaut profiliny Ila hamuje wzrost neurytów [49]. Zmutowane SMN nie wiąże się z profiliną, co z kolei osłabia jej oddziaływanie z aktyną i zaburza aktywność cytoszkieletu aktynowego [50,51].

Białko SMN ulega ekspresji we wszystkich komórkach somatycznych, jednak w motoneuronach jest produkowane w znacząco większych ilościach [26]. Fakt ten częściowo tłumaczy, dlaczego akurat neurony ruchowe rdzenia kręgowego są szczególnie podatne na jego brak i wynikającą z tego atrofię. Wyniki prowadzonych badań sugerują, że białko SMN odgrywa szczególną rolę w procesach komórkowych unikalnych dla neuronów ruchowych [52,53]. Na podstawie dostępnych danych można założyć, że brak SMN prowadzi do upośledzenia tworzenia snRNP i wpływa na składanie wybranej grupy genów, które są ważne dla neuronu ruchowego [54–56]. SMN jednocześnie pełni inne istotne funkcje w aksonach, których wzrost w rdzeniowym zaniku mięśni jest zakłócony [23,43,46,47,55–58].

Białko SMN bierze udział także w innych procesach: endocytozie, autofagii, ubikwitinacji oraz homeostazie mitochondriów i szlaków bioenergetycznych [59].

TERAPIE SMA

Przyczyną rdzeniowego zaniku mięśni są mutacje genu *SMN1*. Ze względu na brak możliwości uzyskania funkcjonalnej formy białka SMN w komórkach do niedawna nie istniała metoda skutecznego leczenia SMA. Stan pacjentów usiłowano poprawić, stosując terapie mające na celu przywrócenie funkcji neuronów ruchowych i mięśni oraz zapobieganie nasileniu objawów choroby.

Jedną ze stosowanych substancji neuroprotektoryjnych był olexosime, pozwalający na leczenie szeregu zaburzeń nerwowo-mięśniowych [60]. Jest to cząsteczka o strukturze podobnej do cholesterolu, należąca do rodziny modulatorów porów mitochondrialnych [61]. Substancja poprawia wydajność procesów oddychania komórkowego, pozwalając neuronom funkcjonować również w stanie deficytu białka SMN. W badaniach przedklinicznych olexosime wykazywał właściwości protekcyjne wobec neuronów i innych typów komórek [62]. Jednak, mimo pozytywnych wyników odnotowanych po pierwszych 12 miesiącach leczenia, dalsze analizy wykazały, że po 18 miesiącach u pacjentów ponownie dochodziło do pogorszenia funkcji motorycznych. Wyniki badania olexosimu prowadzo-

ne w latach 2011–2013 wykazały, że związek może także zapobiegać pogorszeniu funkcji mięśni w atrofi mięśni kręgosłupa [63]. Jednak w czerwcu 2018 r., z powodu problemów technicznych i regulacyjnych oraz konkurencji ze strony potencjalnie bardziej skutecznego leku, wstrzymano dalsze prace nad olexosimem.

Inną strategią terapii SMA jest ochrona mięśni przed atrofią, poprzez zwiększenie ich masy oraz przywrócenie niektórych funkcji na drodze zwiększenia zdolności mięśni do kurczenia się lub poprawy ich siły. Podobnie jak w wypadku neuroprotekcji, także terapie wspomagające komórki mięśniowe mają na celu jedynie spowolnienie lub zatrzymanie postępu choroby. Leki te można stosować w połączeniu z terapiami mającymi na celu zwiększenie poziomu białka SMN.

Jednym z szeregu zidentyfikowanych związków, które są w stanie zwiększyć masę mięśniową jest reldesemtiv, szybko działający aktywator troponiny, regulującej skurcze mięśni poprzecznie prążkowanych i mięśnia sercowego. Zadaniem substancji jest zwiększenie odpowiedzi skurczowej mięśni w sytuacji obniżenia sygnału nerwowego. Reldesemtiv, podobnie jak jego poprzednik – tirasemtiv, spowalnia uwalnianie jonów Ca^{2+} z kompleksu regulującego troponiny, zwiększając wrażliwość sarkomeru na działanie wapnia i tym samym wzmacniając siłę skurczu [64]. Wykazano również, że związek ten potęguje reakcję mięśni szkieletowych na impulsy nerwowe [65], co skłania do hipotezy, że substancja może nasilać skurcze mięśni u pacjentów cierpiących na SMA. Badania kliniczne fazy II potwierdziły pozytywne działanie tirasemtivu u pacjentów SMA typu 2 do 4 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02644668). U pacjentów poddanych ośmiotygodniowemu działaniu leku wykazano znamienne wzrost czasu zmęczenia mięśni, wytrzymałości tlenowej oraz siły mięśni oddechowych. Dane te są szczególnie zachęcające z punktu widzenia potrzeb nastolatków i osób dorosłych ze SMA, u których występuje uporczywe osłabienie mięśni, zmęczenie i upośledzenie ich funkcji.

Reldesemtiv testowano także u pacjentów cierpiących na stwardnienie zanikowe boczne (ALS) (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03160898). Wyniki tego badania nie przyniosły znaczącej poprawy stanu zdrowia.

W celu poprawy siły mięśni stosowano także monoklonalne przeciwciała SRK-015, będące selektywnym i lokalnym inhibitorem miostatyny, która promuje wzrost i różnicowanie komórek mięśniowych oraz poprawia siłę mięśni u myszy SMA [66]. Ponieważ SRK-015 wiąże nieaktywną formę miostatyny, oczekuje się, że terapia spowoduje mniej skutków ubocznych niż wcześniejsze próby celowane w formę aktywną lub receptor. Założenia te potwierdziły badania kliniczne I fazy (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02644777). Trwające obecnie badania fazy II, mają potwierdzić pozytywne działanie i bezpieczeństwo terapeutyczne na siłę mięśni pacjentów z SMA typu 2 i 3 (ClinicalTrials.gov identifier: NCT03921528).

Kilka prób klinicznych związanych z neuroprotekcją i wzmacnianiem komórek mięśni oparto na znanych wcześniej, ale zmienionych związkach, takich jak kwas walproinowy, acetylo-L karnityna, hydroksymocznik feny-

lomaślanu, riluzol i somatotropina. Niestety, mimo obiecujących danych przedklinicznych, rezultaty badań klinicznych, podobnie jak w przypadku olexosimu, nie przyniosły oczekiwanych wyników [67,68].

Ochronę funkcji neuronu ruchowego, modulowanie toksyczności środowiska i zastępowanie populacji komórek nerwowych i komórek gleju umożliwia także wykorzystanie komórek macierzystych. Wykazano, że przeszczep neuronalnych komórek macierzystych lub prekursorów neuronów ruchowych bezpośrednio do rdzenia kręgowego lub do opony do płynu mózgowo-rdzeniowego poprawia fenotyp u myszy SMA [69–71]. Badania z wykorzystaniem terapii komórkami macierzystymi nadal pozostają w fazie eksperymentów [72], a ich wykorzystanie może stanowić istotne działanie uzupełniające w leczeniu SMA, szczególnie u pacjentów, u których rdzeniowy zanik mięśni pojawił się w późniejszym wieku.

MODULACJA SPLICINGU – NUSINERSEN

Nowatorskie podejście do terapii SMA oraz innych chorób genetycznie uwarunkowanych reprezentuje wykorzystanie antysensowych nukleotydów (ang. antisense oligonucleotides, ASO) [73].

ASO to krótkie nici chemicznie modyfikowanych kwasów nukleinowych zaprojektowane tak, by wiązać się z wybraną, komplementarną sekwencją mRNA. W zależności od miejsca wiązania, ASO wpływają na inaktywację transkryptu lub przebieg splicingu, prowadząc do zmiany zawartości eksonów [74].

Odpowiednio zmodyfikowane ASO w zależności od sekwencji mogą odpowiednio prowadzić do wykluczenia lub włączenia eksonu, który zostałby wycięty, tak jak ma to miejsce w przypadku SMA [75].

Wykorzystanie odpowiednich ASO w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni pozwala na włączenie eksonu 7 do transkryptu genu *SMN2*. Tak działa terapeutyczny oligonukleotyd 2'-metoksyetylofosforanowy, nusinersen o handlowej nazwie Spinraza. Antysensowy oligonukleotyd ukierunkowany jest na wiązanie specyficznej sekwencji wyciszającej w intronie pre-mRNA *SMN2* (ang. intron splicing silencer N1, ISS-N1). Jej wiązanie umożliwia włączenie eksonu 7 do białka SMN.

Skuteczność i bezpieczeństwo takiego rozwiązania wykazano w warunkach *in vitro* i *in vivo* na mysim modelu SMA [76–79]. Nusinersen przeszedł także szereg testów klinicznych, a 23. grudnia 2016 r. jego wykorzystanie w leczeniu rdzeniowego zaniku mięśni zostało zatwierdzone przez amerykańską Agencję Żywności i Leków, FDA (Food and Drug Administration). 21. kwietnia 2017 r. nusinersen zatwierdził też Komitet ds. Produktów Leczniczych Stosowanych u Ludzi Europejskiej Agencji Leków (European Medicines Agency, EMA). W Polsce decyzją Ministerstwa Zdrowia od 1. stycznia 2019 r. Spinraza jest na liście leków objętych pełną refundacją dla pacjentów w każdym wieku.

Mimo dobrych efektów klinicznych zastosowanie ASO może być ograniczone. Wiąże się to z wielkością cząsteczek antysensowych oligonukleotydów, które mają bardzo ograniczoną zdolność przekraczania bariery krew-

-mózg. Stąd podawanie nusinersenu polega na wielokrotnym dokanałowym podawaniu leku do płynu mózgowo-rdzeniowego przez nakłucie lędźwiowe. Paradoksalnie, zaletą lokalnego dostarczania leku do ośrodkowego układu nerwowego jest fakt, że umożliwia ono wysokie, lokalne dawkowanie w tkance docelowej, przy niskim obciążeniu wątroby i nerek [80–82].

Podawanie nusinersenu odbywa się wg następującego schematu: na początku leczenia podaje się trzy dawki nasycające, każdą w odstępie 14 dni. Czwartą dawkę nasycającą należy podać 35 dni po trzeciej dawce. Harmonogram leczenia podtrzymującego to jedna dawka co cztery miesiące [83]. Prowadzone obecnie testy kliniczne DEVOTE i SHINE pozwolą na sprawdzenie badania skutków długofalowego podawania nusinersenu – skuteczności i bezpieczeństwa oraz podawania wyższych dawek leku, powiązanych z mniejszą częstotliwością wkłucia lędźwiowego (ClinicalTrials.gov identifier: NCT04089566).

INNE MODULATORY SPLICINGU

Odmiernym podejściem rozwiązującym problem składania genów jest wykorzystanie małych, specyficznych cząsteczek, które podobnie do ASO, mogą wpływać na proces splicingu. Cząsteczki zaprojektowane tak, by z wysoką swoistością umożliwiać włączanie eksonu 7 *SMN2*, mogą stać się potencjalnymi lekami na SMA.

Badanie przesiewowe *in vitro* pozwoliło zidentyfikować cząsteczki RG7800 oraz RG7916 znaną pod nazwą risdiplam. Traktowanie tymi związkami zmodyfikowanych genetycznie myszy z objawami SMA1, doprowadziło do znacznego wzrostu poziomu białka SMN, poprawy funkcji motorycznych i przedłużenia życia (z 18 do 150 dni) [84]. Mechanizm działania RG7800 i RG7916, podobnie jak ASO, polega na bezpośredniej interakcji z dwoma odrębnymi miejscami pre-mRNA *SMN2*. Wiązanie to stabilizuje dotąd niezidentyfikowany kompleks rybonukleoproteiny (RNP), zapewniając specyficzne działanie tych substancji [85].

W dwóch testach klinicznych przeprowadzonych u zdrowych dorosłych i pacjentów z SMA typu 2 i 3 wykazano, że trwające 12 tygodni leczenie RG7800 – doustnym modulatorem splicingu genu *SMN2*, było dobrze tolerowane. Podawanie terapeutycznego prowadziło do zależnego od dawki prawidłowego składania transkryptu *SMN2*, promując wytwarzanie pełnej długości białka i obniżenie ilości mRNA bez eksonu 7 (*SMN-Δ7*). Poziom prawidłowego białka SMN u pacjentów SMA wzrósł nawet dwukrotnie [86].

O ile nusinersen, zatwierdzony przez FDA, wskazany jest do leczenia wszystkich typów SMA, to RG7800 dedykowany jest dla pacjentów z rdzeniowym zanikiem mięśni cierpiących na typ 2 i 3 choroby [86].

Kolejną cząsteczką, której zdolność do włączania 7 eksonu w transkrypcie *SMN2* udowodniono, jest risdiplam. Pierwsze testy związku na pacjentach wykazały dobrą tolerancję i zależną od dawki skuteczność – do 41% wzrostu mRNA genu *SMN2* [87]. Obecnie prowadzone testy risdiplamu znajdują się w II i III fazie badań klinicznych ClinicalTrials.gov identifier: NCT02913482).

TERAPIA GENOWA

Możliwości leczenia chorób uwarunkowanych genetycznie, niepoddających się dotychczasowym metodom terapeutycznym, stwarza terapia genowa. Jedną z strategii terapii genowej opiera się na przeniesieniu prawidłowej kopii genu (tzw. gen terapeutyczny) do komórek, w których występuje zmutowany gen. Geny terapeutyczne zwykle wprowadza się do organizmu chorego dzięki zastosowaniu wektorów wirusowych.

Terapia genowa w SMA pozwala na dostarczenie do komórek motoneuronów funkcjonalnej kopii genu kodującego pełną długość ludzkiego białka SMN [88], tym samym usuwając podstawową przyczynę SMA – utratę genu *SMN1*.

Skuteczne dostarczanie niezmutowanego genu *SMN1* do komórek jest możliwe dzięki zastosowaniu wektora AAV – wirusa towarzyszącego adenowirusom (ang. adeno-associated virus). AAV to małe, niepatogenne wirusy, które mogą skutecznie wnikać do komórek ośrodkowego układu nerwowego, ponieważ „infekują” neurony ruchowe i astrocyty [89].

Najbardziej obiecujące wyniki uzyskano, badając serotyp 9 wirusa AAV, który można podawać pacjentom przez wstrzyknięcie do opony lub ogólnoustrojowo, wykorzystując fakt, iż wirus jest zdolny do przekroczenia bariery krew-mózg. Ta druga możliwość pozwala na nieinwazyjne podanie terapeutycznego genu [90].

Zastosowanie AAV9 jako wektora dostarczającego prawidłową sekwencję nukleotydową ludzkiego genu *SMN1* pozwoliło na opracowanie terapeutycznego onasemnogene AAV9, AVXS-101 o nazwie handlowej Zolgensma.

Zarówno w trwających jak i zakończonych badaniach u pacjentów leczonych AVXS-101 wykazano znaczną poprawę zdolności osiągnięcia kamieni milowych rozwoju ruchowego [91].

Już jednorazowy wlew dożylny dużej dawki wektora wirusowego AAV 9 zawierającego prawidłowy gen *SMN1* u pacjentów cierpiących na SMA typu pierwszego spowodował wydłużenie czasu przeżycia oraz poprawę funkcji motorycznych. W okresie obserwacji do dwóch lat po podaniu terapeutycznego nie obserwowano efektu zaniku ani regresji klinicznej funkcji motorycznych. Jedynym działaniem niepożądanym występującym u niewielkiej części pacjentów było przejściowe i bezobjawowe zwiększenie poziomu aminotransferazy, które ustępowało po podaniu prednizolonu [91].

Ponadto, z dotychczasowych obserwacji wynika, że użycie wektora jest bezpieczne dla organizmu pacjenta, a jego ekspresja ogranicza się jedynie do komórek docelowych. W analizie preparatów tkankowych pobranych podczas autopsji dwóch niemowląt z rdzeniowym zanikiem mięśni leczonych AVXS-101, najwyższe poziomy wektorowego DNA stwierdzono w wątrobie; wirus zidentyfikowano również w mózgu, sercu, pachwinowym węzle chłonny, nerce, płucu, jelitach, trzustce, nerwach obwodowych, mięśniach szkieletowych, rdzeniu kręgowym, śledzionie i grasicy. U pacjentów, którzy otrzymali pojedynczą infuzję dożylną AVXS-101 i byli obserwowani przez 18 miesięcy po infuzji, wektor z terapeutycznym

genem identyfikowano w ślinie, moczu i stolcu. Stężenia wirusa AAV w wydzielinach ustrojowych były jednak niskie i bardzo niskie następnego dnia po infuzji, a następnie w ciągu 1 – 3 tygodni spadły do niewykrywalnego poziomu; stężenia w kale były znacznie wyższe do dwóch tygodni po infuzji i spadały do niewykrywalnego poziomu 1 – 2 miesięcy po wstrzyknięciu [88].

24. maja 2019 r. preparat Zolgensma został zatwierdzony w Stanach Zjednoczonych do leczenia pacjentów w wieku poniżej 2 lat, u których zdiagnozowano SMA, w tym tych, u których wystąpiły pierwsze objawy. Terapia ma na celu usunięcie pierwotnej genetycznej przyczyny SMA i skutecznego zatrzymania postępu choroby poprzez wprowadzenie do komórek nerwowych w pełni funkcjonalnej kopii genu *SMN1* za pomocą jednorazowej infuzji dożylniej.

Obecnie Europejska Agencja Leków wdrożyła procedurę standardowego sprawdzenia leku. Najprawdopodobniej akceptacji terapii w Europie oczekuje się na początku roku 2020.

PODSUMOWANIE

Mimo niewątpliwych sukcesów leczenia SMA wykorzystującego ASO i terapię genową, wciąż nie wiadomo, jakie będą długoterminowe skutki leczenia. Potrzeba nieustających testów klinicznych polegających na monitorowaniu chorych poddanych tym nowatorskim metodom leczniczym. Jedynie wyniki uzyskane dzięki wieloletnim obserwacjom pozwolą na ustalenie zarówno pozytywnych jak i negatywnych skutków terapii oraz umożliwią ocenę trwałości oraz bezpieczeństwa długotrwałego stosowania u pacjentów z SMA terapii zastępczej genów i modulatorów splicingu.

Istotny problem terapii ASO stanowi konieczność wielokrotnego nakłuwania lędźwiowego wykonywanego u pacjentów w celu podania leku. Choć do tej pory procedura ta wydaje się być dobrze tolerowana, nie wiadomo, czy jej wieloletnie powtarzanie nie spowoduje wystąpienia nieprzewidywalnych dziś komplikacji. Alternatywę mogą tu stanowić dooponowe pompy dostarczające terapeutyk.

W trakcie opracowywania (II i III faza badań klinicznych) jest obecnie strategia modulacji splicingu przez biodostępne małe cząsteczki, które specyficznie celują w gen *SMN2* (ClinicalTrials.gov identifier: NCT02913482). Podawanie doustne modulatorów splicingu umożliwiłoby pominięcie konieczności powtarzania nakłucia lędźwiowego i ukierunkowały terapię nie tylko na komórki ośrodkowego układu nerwowego, ale także na inne tkanki.

To właśnie ekspresja białka SMN we wszystkich komórkach jest kolejnym nierozstrzygniętym problemem terapii. Dotychczasowe leczenie powoduje bowiem wzrost poziomu białka SMN jedynie w komórkach ośrodkowego układu nerwowego. Tymczasem na modelu mysim wykazano, że całkowite wyzdrowienie lub wydłużenie długości życia osobników zaobserwowano dopiero po przywróceniu produkcji białka SMN zarówno w ośrodkowym układzie nerwowym, jak i w innych tkankach [85]. Jak dotąd nie wiadomo, czy wyniki tych badań znajdują także potwierdzenie u ludzi, czy są może artefaktem modelu, w który ludzkie geny *SMN2* przenosi się do myszy (myszy posiadają tylko jeden gen *Smn*).

Mimo wielu niewiadomych i problemów związanych z zastosowaniem terapii genowej i modulatorów splicingu u pacjentów cierpiących na SMA, należy podkreślić, że terapie te są jedynymi umożliwiającymi skuteczne przywrócenie prawidłowego fenotypu i wyleczenie pacjenta.

PIŚMIENNICTWO

- [1] Finkel R.S., McDermott M.P., Kaufmann P., et al.: Observational study of spinal muscular atrophy type I and implications for clinical trials. *Neurology* 2014; 83: 810–817.
- [2] Munsat T.L., Davies K.E.: International SMA Consortium Meeting (26–28 June 1992, Bonn, Germany). *Neuromuscul Disord* 1992; 2: 423–428.
- [3] Russman B.S.: Spinal muscular atrophy: Clinical classification and disease heterogeneity. *J Child Neurol* 2007; 22: 946–951.
- [4] Wang C.H., Finkel R.S., Bertini E.S., et al.: Consensus statement for standard of care in spinal muscular atrophy. *J Child Neurol* 2007; 22: 1027–1049.
- [5] Lefebvre S., Bürglen L., Reboullet S., et al.: Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 1995; 80: 155–165.
- [6] Verhaart I.E.C., Robertson A., Wilson I.J., et al.: Prevalence, incidence and carrier frequency of 5q-linked spinal muscular atrophy - A literature review. *Orphanet J Rare Dis* 2017; 12.
- [7] Sugarman E.A., Nagan N., Zhu H., et al.: Pan-ethnic carrier screening and prenatal diagnosis for spinal muscular atrophy: Clinical laboratory analysis of >72 400 specimens. *Eur Hum Genet* 2012; 20: 27–32.
- [8] Hahnen E., Forkert R., Marke C., et al.: 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* 1995; 4: 1927–1933.
- [9] Feldkötter M., Schwarzer V., Wirth R., et al.: 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* 2002; 70: 358–368.
- [10] Fujii H., Marsh C., Cairns P., et al.: Genetic divergence in the clonal evolution of breast cancer. *Cancer Res* 1996; 56: 1493–1497.
- [11] Lorson C.L., Hahnen E., Androphy E.J., et al.: A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci* 1999; 96: 6307–6311.
- [12] Burnett B.G., Muñoz E., Tandon A., et al.: Regulation of SMN protein stability. *Mol Cell Biol* 2009; 29: 1107–1115.
- [13] Gubitz A., Feng W., Dreyfuss G.: The SMN complex. *Exp Cell Res* 2004; 296: 51–56.
- [14] Calucho M., Bernal S., Alías L., et al.: Correlation between SMA type and SMN2 copy number revisited: An analysis of 625 unrelated Spanish patients and a compilation of 2834 reported cases. *Neuromuscul Disord* 2018; 28: 208–215.
- [15] Bernal S., Also-Rallo E., Martínez-Hernández R., et al.: Platin 3 expression in discordant spinal muscular atrophy (SMA) siblings. *Neuromuscul Disord* 2011; 21: 413–419.
- [16] Burghes A.H.: When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am. J. Hum Genet* 1997; 61: 9–15.
- [17] Beattie C.E., Kolb S.J.: Spinal muscular atrophy: Selective motor neuron loss and global defect in the assembly of ribonucleoproteins. *Brain Res* 2018; 1693: 92–97.
- [18] Cartegni L., Krainer A.R.: Disruption of an SF2/ASF-dependent exonic splicing enhancer in SMN2 causes spinal muscular atrophy in the absence of SMN1. *Nat Genet* 2002; 30: 377–384.
- [19] Bebee T.W., Gladman J.T., Chandler D.S.: Splicing of the Survival Motor Neuron genes and implications for treatment of SMA. *Front Biosci* 2010; 15: 1191–1204.
- [20] Seo J., Singh N.N., Ottesen E.W., et al.: Oxidative stress triggers body-wide skipping of multiple exons of the spinal muscular atrophy gene. *PLoS One* 2016; 11(4): e0154390.
- [21] Singh N.N., Seo J., Rahn S.J., et al.: A Multi-Exon-Skipping Detection Assay Reveals Surprising Diversity of Splice Isoforms of Spinal Muscular Atrophy Genes. *PLoS One* 2012; 7(11): e49595.
- [22] Rochette C., Gilbert N., Simard L.: SMN gene duplication and the emergence of the SMN2 gene occurred in distinct hominids: SMN2 is unique to Homo sapiens. *Hum Genet* 2001; 108: 255–266.
- [23] Schrank B., Gotz R., Gunnarsen J.M., et al.: 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* 1997; 94: 9920–9925.
- [24] Paushkin S., Charroux B., Abel L., et al.: The Survival Motor Neuron Protein of *Schizosaccharomyces pombe*. *J Biol Chem* 2000; 275: 23841–23846.
- [25] Miguel-Aliaga I., Culetto E., Walker D.S., et al.: 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* 1999; 8: 2133–2143.
- [26] Battaglia G., Princivalle A., Forti F., et al.: Expression of the SMN Gene, the Spinal Muscular Atrophy Determining Gene, in the Mammalian Central Nervous System. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1961–1971.
- [27] Coovet D., Le T.T., McAndrew P.E., et al.: The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 1997; 6: 1205–1214.
- [28] Lorson C.L., Strasswimmer J., Yao J.M., et al.: SMN oligomerization defect correlates with spinal muscular atrophy severity. *Nat Genet* 1998; 19: 63–66.
- [29] Gray K.M., Kaifer K.A., Baillat D., et al.: Self-oligomerization regulates stability of survival motor neuron protein isoforms by sequestering an SCF Smb1 degen. *Mol Biol Cell* 2018; 29: 96–110.
- [30] Burghes A.H.M., Beattie C.E.: Spinal muscular atrophy: why do low levels of survival motor neuron protein make motor neurons sick? *Nat Rev Neurosci* 2009; 10: 597–609.
- [31] Han K.J., Foster D., Harhaj E.W., et al.: Monoubiquitination of survival motor neuron regulates its cellular localization and Cajal body integrity. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 1392–1405.
- [32] Lafarga V., Tapia O., Sharma S., et al.: CBP-mediated SMN acetylation modulates Cajal body biogenesis and the cytoplasmic targeting of SMN. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75: 527–546.
- [33] Ogg S.C., Lamond A.I.: Cajal bodies and coilin—moving towards function. *J Cell Biol* 2002; 159: 17–21.
- [34] Cioce M., Lamond A.I.: Cajal Bodies: A Long History of Discovery. *Annu. Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 105–131.
- [35] Raker V.A., Hartmuth K., Kastner B., et al.: Spliceosomal U snRNP core assembly: Sm proteins assemble onto an Sm site RNA nonanucleotide in a specific and thermodynamically stable manner. *Mol Cell Biol* 1999; 19: 6554–6565.
- [36] Li D.K., Tisdale S., Lotti F., et al.: SMN control of RNP assembly: From post-transcriptional gene regulation to motor neuron disease. *Semin Cell Dev Biol* 2014; 32: 22–29.
- [37] Pellizzoni L., Yong J., Dreyfuss G.: Essential Role for the SMN Complex in the Specificity of snRNP Assembly. *Science* 2002; 298: 1775–1779.
- [38] Blais A., Tsikitis M., Acosta-Alvear D., et al.: An initial blueprint for myogenic differentiation. *Genes Dev* 2005; 19: 553–569.
- [39] Cam H., Balciunaite E., Blais A., et al.: A Common Set of Gene Regulatory Networks Links Metabolism and Growth Inhibition. *Mol Cell* 2004; 16: 399–411.
- [40] Di Penta A., Mercaldo V., Florenzano F., et al.: Dendritic LSml/CBP80-mRNAs mark the early steps of transport commitment and translational control. *J Cell Biol* 2009; 184: 423–435.
- [41] Li H., Custer S.K., Gilson T., et al.: -COP binding to the survival motor neuron protein SMN is required for neuronal process outgrowth. *Hum Mol Genet* 2015; 24: 7295–7307.
- [42] Briese M., Saal-Bauernschubert L., Ji C., et al.: hnRNP R and its main interactor, the noncoding RNA 7SK, coregulate the axonal transcriptome of motoneurons. *Proc Natl Acad Sci* 2018; 115: 2859–2868.
- [43] Rossoll W., Kröning A.K., Ohndorf U.M., et al.: 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* 2002; 11: 93–105.
- [44] Mourelatos Z., Abel L., Yong J., et al.: SMN interacts with a novel family of hnRNP and spliceosomal proteins. *EMBO J* 2001; 20: 5443–5452.
- [45] Rossoll W., Jablonka S., Andreassi C., et al.: Smn, the spinal muscular atrophy-determining gene product, modulates axon growth and localization of β -actin mRNA in growth cones of motoneurons. *J Cell Biol* 2003; 163: 801–812.
- [46] Zhang H.L., Pan F., Hong D., et al.: Active transport of the survival motor neuron protein and the role of exon-7 in cytoplasmic localization. *J Neurosci* 2003; 23: 6627–6637.
- [47] McWhorter M.L., Monani U.R., Burghes A.H.M., et al.: Knockdown of the survival motor neuron (Smn) protein in zebrafish causes defects in motor axon outgrowth and pathfinding. *J Cell Biol* 2003; 162: 919–932.
- [48] Lambrechts A., Braun A., Jonckheere V., et al.: Profilin II is alternatively spliced, resulting in profilin isoforms that are differentially expressed and have distinct biochemical properties. *Mol Cell Biol* 2000; 20: 8209–8219.
- [49] Sharma A., Lambrechts A., Hao L. thi, et al.: 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.* 2005; 309: 185–197.
- [50] Nölle A., Zeug A., van Bergeijk J., et al.: The spinal muscular atrophy disease protein SMN is linked to the rho-kinase pathway via profilin. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4865–4878.
- [51] Bowerman M., Shafey D., Kothary R.: Smn Depletion Alters Profilin II Expression and Leads to Upregulation of the RhoA/ROCK Pathway and Defects in Neuronal Integrity. *J Mol Neurosci* 2007; 32: 120–131.
- [52] Martinez T.L., Kong L., Wang X., et al.: Survival motor neuron protein in motor neurons determines synaptic integrity in spinal muscular atrophy. *J Neurosci* 2012; 32: 8703–8715.
- [53] Tsuiji H., Iguchi Y., Furuya A., et al.: Spliceosome integrity is defective in the motor neuron diseases ALS and SMA. *EMBO Mol Med* 2013; 5: 221–234.
- [54] Eggert C., Chari A., Lagerbauer B., et al.: Spinal muscular atrophy: the RNP connection. *Trends Mol Med* 2006; 12: 113–121.
- [55] Pellizzoni L.: Chaperoning ribonucleoprotein biogenesis in health and disease. *EMBO Rep* 2007; 8: 340–345.
- [56] Gabanella F., Butchbach M.E.R., Saieva L., et al.: Ribonucleoprotein Assembly Defects Correlate with Spinal Muscular Atrophy Severity and Preferentially Affect a Subset of Spliceosomal snRNPs. *PLoS One* 2007; 2(9): e921.
- [57] Carrel T.L., McWhorter M.L., Workman E., et al.: Survival Motor Neuron Function in Motor Axons Is Independent of Functions Required for Small Nuclear Ribonucleoprotein Biogenesis. *J Neurosci* 2006; 26: 11014–11022.
- [58] Fan L., Simard L.R.: Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet* 2002; 11: 1605–1614.
- [59] Chaytow H., Huang Y.T., Gillingwater T.H., et al.: The role of survival motor neuron protein (SMN) in protein homeostasis. *Cell Mol Life Sci* 2018; 75: 3877–3894.
- [60] Weber J.J., Clemensson L.E., Schiöth H.B., et al.: Olesoxime in neurodegenerative diseases: Scrutinising a promising drug candidate. *Biochem Pharmacol* 2019; 168: 305–318.
- [61] Martin L.J.: Olesoxime, a cholesterol-like neuroprotectant for the potential treatment of amyotrophic lateral sclerosis. *IDrugs* 2010; 13: 568–580.
- [62] Bordet T., Buisson B., Michaud M., et al.: Identification and Characterization of Cholest-4-en-3-one, Oxime (TR019622), a Novel Drug Candidate for Amyotrophic Lateral Sclerosis. *J Pharmacol Exp Ther* 2007; 322: 709–720.
- [63] Bertini E., Dessaud E., Mercuri E., et al.: Safety and efficacy of olesoxime in patients with type 2 or non-ambulatory type 3 spinal muscular atrophy: a randomised, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Neurol* 2017; 16: 513–522.
- [64] Hwee D.T., Kennedy A.R., Hartman J.J., et al.: The Small-Molecule Fast Skeletal Troponin Activator, CK-2127107, Improves Exercise Tolerance in a Rat Model of Heart Failure. *J Pharmacol Exp Ther* 2015; 353: 159–168.
- [65] Andrews J.A., Miller T.M., Vijayakumar V., et al.: CK-2127107 amplifies skeletal muscle response to nerve activation in humans. *Muscle Nerve* 2018; 57: 729–734.
- [66] Feng Z., Ling K.K.Y., Zhao X., et al.: Pharmacologically induced mouse model of adult spinal muscular atrophy to evaluate effectiveness of therapeutics after disease onset. *Hum Mol Genet* 2016; 25: 964–975.
- [67] Kirschner J., Schorling D., Hauschke D., et al.: Somatropin treatment of spinal muscular atrophy: A placebo-controlled, double-blind crossover pilot study. *Neuromuscul Disord* 2014; 24: 134–142.
- [68] Gandini R., Dossena S., Vezzoli V., et al.: LSml associates with the plasma membrane and acts as a co-factor in cell volume regulation. *Cell Physiol Biochem* 2008; 22: 579–590.
- [69] Corti S., Locatelli F., Papadimitriou D., et al.: Transplanted ALDHhiSSC10 neural stem cells generate motor neurons and delay disease progression of nmd mice, an animal model of SMARD1. *Hum Mol Genet* 2006; 15: 167–187.
- [70] Corti S., Nizzardo M., Nardini M., et al.: Neural stem cell transplantation can ameliorate the phenotype of a mouse model of spinal muscular atrophy. *J Clin Invest* 2008; 118: 3316–3330.
- [71] Corti S., Nizzardo M., Simone C., et al.: Genetic Correction of Human Induced Pluripotent Stem Cells from Patients with Spinal Muscular Atrophy. *Sci Transl Med* 2012; 4: 162–165.
- [72] Ando S., Funato M., Ohuchi K., et al.: The Protective Effects of Levetiracetam on a Human iPSCs-Derived Spinal Muscular Atrophy Model. *Neurochem Res* 2019; 44: 1773–1779.

- [73] Godfrey C., Desviat L.R., Smedsrød B., et al.: Delivery is key: lessons learnt from developing splice switching antisense therapies. *EMBO Mol Med* 2017; 9: 545–557.
- [74] Sazani P., Kole R.: Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest* 2003; 112: 481–486.
- [75] Havens M.A., Hastings M.L.: Splice-switching antisense oligonucleotides as therapeutic drugs. *Nucleic Acids Res* 2016; 44: 6549–6563.
- [76] Zanetta C., Riboldi G., Nizzardo M., et al.: Molecular, genetic and stem cell-mediated therapeutic strategies for spinal muscular atrophy (SMA). *J Cell Mol Med* 2014; 18: 187–196.
- [77] Hua Y., Sahashi K., Rigo F., et al.: Peripheral SMN restoration is essential for long-term rescue of a severe spinal muscular atrophy mouse model. *Nature* 2011; 478: 123–126.
- [78] Nizzardo M., Simone C., Salani S., et al.: Effect of combined systemic and local morpholino treatment on the spinal muscular atrophy 7 mouse model phenotype. *Clin Ther* 2014; 36: 340–356.
- [79] Porensky P.N., Mitropant C., McGovern V.L., et al.: A single administration of morpholino antisense oligomer rescues spinal muscular atrophy in mouse. *Hum Mol Genet* 2012; 21: 1625–1638.
- [80] Chiriboga C.A., Swoboda K.J., Darras B.T., et al.: Results from a phase 1 study of nusinersen (ISIS-SMN Rx) in children with spinal muscular atrophy. *Neurology* 2016; 86: 890–897.
- [81] Finkel R.S., Chiriboga C.A., Vajsaar J., et al.: Treatment of infantile-onset spinal muscular atrophy with nusinersen: a phase 2, open-label, dose-escalation study. *Lancet* 2016; 388: 3017–3026.
- [82] Rigo F., Chun S.J., Norris D.A., et al.: Pharmacology of a central nervous system delivered 2'-O-methoxyethyl- modified survival of motor neuron splicing oligonucleotide in mice and nonhuman primates. *J Pharmacol Exp Ther* 2014; 350: 46–55.
- [83] Kletzl H., Marquet A., Günther A., et al.: The oral splicing modifier RG7800 increases full length survival of motor neuron 2 mRNA and survival of motor neuron protein: Results from trials in healthy adults and patients with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2019; 29(1):21–29.
- [84] Naryshkin N.A., Weetall M., Dakka A., et al.: Motor neuron disease. SMN2 splicing modifiers improve motor function and longevity in mice with spinal muscular atrophy. *Science* 2014; 345: 688–693.
- [85] Sivaramakrishnan M., McCarthy K.D., Campagne S., et al.: Binding to SMN2 pre-mRNA-protein complex elicits specificity for small molecule splicing modifiers. *Nat Commun* 2017; 8: 1476.
- [86] Kletzl H., Marquet A., Günther A., et al.: The oral splicing modifier RG7800 increases full length survival of motor neuron 2 mRNA and survival of motor neuron protein: Results from trials in healthy adults and patients with spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord* 2019; 29: 21–29.
- [87] Sturm S., Günther A., Jaber B., et al.: A phase 1 healthy male volunteer single escalating dose study of the pharmacokinetics and pharmacodynamics of risdiplam (RG7916, R07034067), a SMN2 splicing modifier. *Br J Clin Pharmacol* 2019; 85: 181–193.
- [88] Byrnes A.: May 24, 2019 Summary Basis for Regulatory Action - ZOLGENSMA. 2019, [15 screen pages] Address; <https://www.fda.gov/media/127961>.
- [89] Hammond S.L., Leek A.N., Richman E.H., et al.: Cellular selectivity of AAV serotypes for gene delivery in neurons and astrocytes by neonatal intracerebroventricular injection. *PLoS One* 2017; 12(12): e0188830.
- [90] Schuster D.J., Dykstra J.A., Riedl M.S., et al.: Biodistribution of adeno-associated virus serotype 9 (AAV9) vector after intrathecal and intravenous delivery in mouse. *Front Neuroanat* 2014; 8: 42.
- [91] Mendell J.R., Al-Zaidy S., Shell R., et al.: Single-Dose Gene-Replacement Therapy for Spinal Muscular Atrophy. *N Engl J Med* 2017; 377: 1713–1722.

Adres do korespondencji.

Anna Szczerba: Katedra i Zakład Biologii Komórki, Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu; ul. Rokietnicka 5D, Poznań
 abosacka@ump.edu.pl