

TREBALL 3

Expressió de la colina acetiltransferasa a la medul·la espinal de fetus amb Atròfia Muscular Espinal

Choline acetyltransferase expression in fetal Spinal Muscular Atrophy spinal cord

Experimental Neurology, 2003 (sotmès; registre EXNR287).

Fins aquí havíem trobat que als fetus amb AME tipus I hi havia un increment significatiu de la mort cel·lular programada, reflectit per l'alta fragmentació del DNA de les neurones motores de la banya anterior a la medul·la espinal. Per altra banda, havíem observat una disminució en l'expressió de les proteïnes antiapoptòtiques Bcl-2 i Bcl-X en el mateix teixit. Això ens va fer pensar que aquestes dues proteïnes jugaven un paper a l'hora d'augmentar la mort cel·lular en els individus afectats per la malaltia. Arribats a aquest punt de la investigació, ens vam plantejar analitzar si la funcionalitat d'aquestes cèl·lules estava afectada. Per fer-ho, vam estudiar l'expressió de l'enzim colina acetiltransferasa (ChAT), el marcador de funció colinèrgica més específic. Vam analitzar fetus AME tipus I i els vam comparar amb controls, i els resultats ens van mostrar que a les 10 setmanes de desenvolupament ja hi havia expressió de la ChAT, essent aquest el primer estadi estudiat. L'expressió va anar augmentat amb les setmanes, però els fetus AME van mostrar una reducció en els nivells de ChAT. Es van detectar neurones motores amb una immunoreacció positiva i d'altres negativa, sense detectar-se canvis morfològics aparents. Tot i això, la proporció de neurones motores ChAT negatives va ser similar en els dos grups. A més a més, a les cèl·lules ChAT negatives fetals no s'observaven canvis patològic, però sí després del naixement. La disminució en l'expressió de ChAT podria ser deguda al menor nombre de neurones motores als individus afectes. Per tant, és possible que les neurones motores que sobrevisquessin a l'augment de la mort cel·lular programada que es dona als fetus AME, tinguin una funció colinèrgica similar a la dels controls, al menys durant aquesta etapa del desenvolupament.

CHOLINE ACETYLTRANSFERASE EXPRESSION IN FETAL SPINAL MUSCULAR ATROPHY SPINAL CORD

Carolina Soler-Botija¹, BSc, Ivón Cuscó¹, BSc, Eva López¹, PhD, Isidre Ferrer², MD, PhD, Agustín Clua³, BSc, Montserrat Baiget¹, PhD, Eduardo F. Tizzano¹, MD, PhD.

1. Servei de Genètica and Institut de Recerca, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain.
2. Institut de Neuropatologia, Departament de Biologia Cel·lular i Anatomia Patològica, Hospital Prínceps de España, L'Hospitalet de Llobregat, Spain.
3. Servei d'Anatomia Patològica, Hospital de Sant Pau, Barcelona, Spain.

Manuscript contents: title page, abstract, 13 text pages, 20 references, 1 table, 4 figures,

Running head: ChAT expression in SMA

This work was funded by Telemarató TV3 Malalties Hereditaries 98-810, Premi Ferrer Salat and by FIS grants 00-0481 and 02-1275.

Reprint requests and correspondence to:

Eduardo F. Tizzano, M.D., Ph.D. Genetics, Hospital de Sant Pau

Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain. Fax: +34-93-2919494, Tel: +34-93-2919361.

E-mail: etizzano@hsp.santpau.es

ABSTRACT

Degeneration and loss of the motor neurons of the spinal cord are the major neuropathologic findings in SMA. We investigated the expression of ChAT, the most specific marker for cholinergic neurons, during human development of the spinal cord in control and SMA fetuses and newborns. Cholinergic alpha-motor neurons of the spinal cord expressing ChAT were found at 10 weeks, the earliest stage analyzed. The expression increased towards the neonatal period. Fetal SMA spinal cords showed reduced ChAT expression with respect to controls although the proportion of ChAT negative motor neurons was similar in the two groups. Moreover, SMA ChAT negative motor neurons showed detectable pathological changes, such as early chromatolysis, only after birth. Decreased ChAT expression could be the consequence of fewer motor neurons in the SMA spinal cord. This suggests that the surviving motor neurons in SMA fetuses could have a cholinergic function similar to that of controls.

Key words: ChAT, human development, motor neurons, SMA.

INTRODUCTION

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neurodegenerative disease that affects spinal cord motor neurons, resulting in progressive muscular atrophy. Although the pathological features of this disorder have been well described, the primary pathogenesis remains to be determined. Childhood SMAs have been divided into three types based on age of onset and clinical severity: type I (severe, Werdnig-Hoffman disease), type II (intermediate) and type III (mild/moderate, Kugelberg-Welander disease). These three clinical forms have been mapped in the 5q13 region containing an inverted repeat harbouring several duplicated genes: the survival motor neurone (SMN) gene (Lefebvre et al., 1995), the neuronal apoptosis-inhibitor protein (NAIP) gene (Roy et al., 1995), the p44 gene (subunit of basal transcription factor TFIIF) (Bürglen et al., 1997; Carter et al., 1997) and the SERF (formerly H4F5) gene (Scharf et al., 1998). Mutations of the survival motor neuron (SMN1) gene are responsible for SMA. The SMN1 gene is duplicated with a highly homologous copy, SMN2, which may act as a phenotypic modifier of the disease (Lefebvre et al., 1995). In the severe type of SMA, the most important changes are degeneration and loss of the α -motor neurons of the anterior horn of the spinal cord. The α -motor neuron is one of the representative cholinergic neurons in which acetylcholine (ACh) is a neurotransmitter. Choline acetyltransferase (ChAT), the enzyme which catalyses the biosynthesis of acetylcholine, is one of the most specific markers for determining the functional state of cholinergic neurons in the central and peripheral nervous systems (Wu et al., 1994). A reduced expression of ChAT can be attributed to the loss of function in motor neurons (Oda et al., 1995). Indeed, alteration in the normal function and/or expression of ChAT has been described in neurodegenerative disorders such as amyotrophic lateral sclerosis, Huntington's disease and Alzheimer's disease (Whitehouse et al., 1982; Perry et al., 1986; Oda et al., 1995; Wetts and Vaughn, 1996). Although some reports on ChAT activity or expression during spinal cord development have been published (Mahoney et al., 1971; Clowry et al., 2000), there are no morphological or functional studies on ChAT in the spinal cord of SMA.

The main objective of our work was to study SMA during development in an attempt to gain some insight into the mechanism of the disease. A significant increase in DNA fragmentation, suggesting a mechanism involving an alteration in programmed cell death during fetal development, has been observed in type I SMA (Soler-Botija et al., 2002; Fidzianska and Rafalowska, 2002). However, other motor neuron changes have not been detected at this stage (Soler-Botija et al., 2002). This apparent normality raises the question of whether fetal motor neurons are more sensitive to cell death or whether they are already dysfunctional at this stage. Moreover, a down regulation in expression of Bcl-2 and Bcl-X proteins have been detected in SMA fetal spinal cords, consistent with a role for both

proteins in the aberrant programmed cell death observed in type I SMA (Soler-Botija et al., 2003).

In the present study, the expression of the ChAT enzyme was examined in the human spinal cord during fetal development using RT-PCR, immunoblot and immunohistochemistry methods, and compared with SMA fetuses.

MATERIALS AND METHODS

Human samples

The project was approved by the Ethics Committee and the Research Institute at the Hospital of Sant Pau, and written consent from the family was obtained for each case. The identification of SMN, the SMA disease gene allowed us to identify fetuses predicted for having SMA type I in families with a previous affected patient. SMA fetuses were collected from therapeutic abortions after confirmation of a homozygous deletion of exon 7 and 8 of the SMN gene. The fetal material was obtained immediately after elective terminations of pregnancy. Gestational age was determined by ultrasound measurements. Fourteen fetuses with optimal tissue preservation were considered in the present study: 12 controls (10-11 weeks n=5; 15 weeks n= 4; 18 weeks n=2 and 22 weeks n=1) and 5 type I SMA specimens (15 weeks n=4 and 22 weeks n=1).

Postnatal spinal cords from autopsy material from 1 newborn without SMA and 1 newborn with type I SMA (homozygously deleted for SMN1) were also studied.

RT-PCR

RNA extraction for experiments was possible only in 15-week samples. The spinal cords from control and SMA fetuses of 15 weeks' gestational age were immediately homogenized in 1 ml of TRIZOL reagent (Invitrogen Corporation, Prat del Llobregat, Barcelona, Spain) and processed according to the manufacturer's instructions. Total RNA was used as a template for the RT-PCR reaction. The first strand cDNA was generated with oligo(dT) primers, and the primers designed to amplify ChAT were: 5'-AGCCAACTGGGTGTCTGAGT-3' (forward) and 5'-GAGACGGCGGAAATTAATGA-3' (reverse) which included exon 3 to exon 6 of the ChAT gene. This region is preserved in several species. A pair of β -actin primers (forward: 5'-TACGCCAACACAGTGCTGTCTG-3' and reverse: 5'-CTGCTTGCTGATCCACATCTGC-3') were simultaneously used with the ChAT primers to amplify the transcripts of β -actin as an internal control for quantification (see below). Amplification was performed in 25 μ l volume containing 20 μ M dNTPs, 1 U Taq DNA polymerase (Promega, Madison, WI, USA) 0.6 pM of ChAT primers, 0.2 pM of β -actin primers and 1.5 mM MgCl₂; the reaction conditions were 94°C for 10 min, 30 cycles of 94°C for 1 min, 57°C for 1 min, 72°C for 1 min, and a final extension at 72°C for 10

min. The PCR products were visualized on ethidium bromide 1.5 % Nusieve GTG agarose gel (FMC Bioproducts, Rockland, ME, USA) after electrophoresis. The experiments were performed four times.

Immunoblot

Spinal cords from 3 control fetuses (10, 15 and 22 weeks) and 2 type I SMA fetuses (15 and 22 weeks) were available and processed. Samples were immediately homogenized in Nicholson treatment buffer (125 mM TrisHCl, pH 6.8; 4% SDS; 4M urea; 5% mercaptoethanol; 10% glycerol; 0.001% bromophenol blue) (Nicholson et al., 1989) and then boiled for 5 minutes. The extracts were separated by SDS-PAGE using a mini-protean system (Bio-Rad, Madrid, Spain) with low range molecular weight standards (Bio-Rad, Madrid, Spain). Protein analyzed on gel electrophoresis was electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were then washed with TRIS-buffered solution pH 7.4 and 0.1% Tween-20 (TTBS), and blocked for 60 min with TTBS containing 5% skimmed milk and 1 % BSA. The membranes were incubated overnight at 4°C with the polyclonal anti-Choline Acetyltransferase (CHEMICON, Hofheim, Germany) at a dilution of 1:200. After washing, the immunoblots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit secondary antibody (1:1000 dilution; DAKO, St. Just Desvern, Barcelona, Spain) for 1 h at room temperature, washed again and developed with the SuperSignal Chemiluminescent Substrate (PIERCE, Rockford, IL, USA). Stripping of the western blot and subsequent re-probing with a monoclonal anti-tubulin antibody (1:500 dilution) showed equal loading of the gel in all the samples. Pre-absorption of the anti-ChAT antibody with recombinant ChAT protein was used to test the specificity of the antibody. The experiments were performed four times.

Densitometric analyses

RT-PCR and Western blot densitometric analyses were performed, scanning and analyzing the ChAT, β -actin and β -tubulin band intensities using the imaging analyser Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD, USA) to calculate their ratios. The level of ChAT relative to β -actin or β -tubulin was determined by dividing the scanned density of ChAT bands by the scanned density of β -actin or β -tubulin for each lane.

Immunohistochemistry

Spinal cords from 9 control fetuses (10, 15, 18 and 22 weeks) and 5 type I SMA fetuses (15 and 22 weeks) as well as samples from two neonates (control and SMA) were available and processed. All samples obtained were analyzed in the upper lumbar (1-2) segments. Each sample was immediately fixed by immersion with 4% paraformaldehyde

and embedded in paraffin. Five μm -thick sections were mounted onto Poly-L-Lysine 50% treated slides and stained with haematoxylin and eosin. De-waxed sections were processed for immunohistochemistry. After blocking endogenous peroxidase with hydrogen peroxide and methanol, the sections were treated with sodium citrate buffer 10 mM pH6 for 25 minutes at 100°C and left overnight. Sections were then blocked with normal serum for 1h at room temperature (1:5 dilution) and incubated at 4°C overnight with a goat anti-ChAT primary polyclonal antibody diluted at 1:100 (CHEMICON, Hofheim, Germany). As a negative control, we incubated sections with the blocking solution without the primary antibody. After the incubation, the sections were exposed to the anti-goat biotinylated secondary antibody for 10 minutes and, finally, to streptavidin-peroxidase for 10 minutes at room temperature (HRP Rabbit/Mouse/Goat Universal LSAB[®]+kit, DAKO, St. Just Desvern, Barcelona, Spain). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were counterstained with haematoxylin.

Counting of ChAT positive motor neurons and statistics

Motor neurons of the fetal anterior horn were morphologically categorized as those having a large nucleus and a prominent nucleolus surrounded by a rim of cytoplasm. In an attempt to establish the difference in the percentage of positive motor neurons in the anterior horn, the strong (++), weak (+) and non-detectable (-) ChAT immunostained motor neurons in sections from the spinal cord of the 15 and 22 week samples were counted. All the sections were blindly examined, counted and reviewed at various magnifications with a Nikon ES-400 microscope, and the images and data were processed using Visilog version 5 (Noesis Vision Inc., St. Lauren, Quebec, Canada). To compare the two groups, a contingency table and chi-square test were applied independently to weeks 15 and 22. The temporal effect was also evaluated independently for these periods in both groups. Frequency differences were expressed as odds ratios with 95% confidence intervals. An odds ratio was considered to be significant if the value of the lower 95% confidence interval did not fall below 1.00. Calculation analysis was performed with SPSS 10.0.

RESULTS

RT-PCR

A 403-bp band corresponding to the ChAT transcript was detected in 15-week samples of controls and SMA. Four separate experiments showed an average band intensity ratio ChAT/ β -actin of 0.30 in the control sample and 0.13 in SMA (Figure 1).

Immunoblot

Analysis of total proteins from spinal cord demonstrated expression of the 69-kDa

ChAT enzyme isoform at 10 weeks' gestational age. There was a marked increase in this expression at 15 weeks and it was maintained at 22 weeks (Figure 2). An additional band of 82-kDa compatible with a ChAT isoform was detected in control and SMA samples. This band was not detected in the control 15-week sample and was very faint in the 22-week SMA sample (Figure 2). At 15 weeks, the band intensity showed a ratio ChAT/ β -tubulin of 0.64 in the control sample, whereas it was 0.63 in the SMA sample. At 22 weeks the ratio was 0.62 in the control sample, whereas it stood at 0.23 in the SMA sample.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry using monoclonal anti-ChAT antibody in human fetal spinal cords showed that the ChAT expression was weak in neuroblasts and sparse neurons during their migration towards the anterior horn in 10-week control fetuses (Figures 3 A and B). At later stages, the expression was detected predominantly in the medial and lateral anterior horn motor neuron clusters (Figure 3 C). At the cell level, immunostaining was detectable in perykaria, although not all motor neurons expressed the ChAT enzyme at the same time (Figure 3 D). Expression in each motor neuron was defined as strong (++), weak (+) or non-detectable (-) (Table 1).

In SMA fetuses, the pattern of expression was similar to that of controls, although a more notable ChAT expression was found in dendrites and axons at 15 weeks (Figure 3 E). The patchy pattern of expression detected in control motor neurons was also observed in the SMA samples (Figure 3 F). Postnatal motor neurons with normal appearance expressed a large amount of ChAT while others expressed almost none. Motor neurons showed, in the course of time, a tendency to express ChAT focally in the perikaryon. SMA motor neurons with degenerative changes such as early chromatolysis or kariolysis did not express ChAT (Figure 4).

Counting of ChAT positive motor neurons

A total of 1005 motor neurons from the anterior horn from 3 control samples and 1458 motor neurons from the anterior horn from 4 SMA samples were counted. Morphological changes such as nuclear displacement, early chromatolysis or kariolysis were not found in ChAT positive and negative motor neurons at this level of detection. The proportion of strong, weak and non-immunostained fetal motor neurons was roughly similar in the control and SMA samples (Table 1). The difference detected at week 15 in the percentage of ChAT negative motor neurons (54.9% in control versus 49.1% in SMA) reached statistic significance ($p=0.018$)(OR 1.26, CI 95% 1.04-1.53). At 22 weeks this percentage was virtually identical (58.1% versus 58.2%) ($p=1.000$)(OR 1.00 CI 95% 0.69-1.43). The temporal evolution between 15 and 22 weeks indicated a slight increase in the percentage of negative cells in both groups: 54.9 to 58.1% in controls ($p=0.352$) versus

49.1% to 58.2% in SMA ($p=0.017$). The analyses were repeated separating the ChAT positive motor neurons into two groups (++) and (+), and the results coincided.

DISCUSSION

To the best of our knowledge, a systematic study of the pattern of ChAT expression in the spinal cord of control and SMA fetuses and neonates had not been carried out to date. In control fetuses, the expression increased from 10 to 22 weeks of gestational age. This is in agreement with the studies of Clowry et al. (2000) in which immunoreactivity for ChAT in motor neurons from 11 to 14 weeks postconceptional age was clearly positive. The onset of ACh synthesis begins very early in the motor neuron development. It is possible that ACh plays a role in directing further pathways of neuron differentiation and in interacting with target cells (Vaca, 1988; Biagioni et al., 2000). Moreover, ChAT immunoreactivity has been shown in pre-migratory and early migratory neurons of the rat spinal cord (Phelps et al., 1990). In our work, sparse positive ChAT immunoreactivity in migratory neurons was detected at an early stage. The cells that showed a more intense reactivity were those from the medial and lateral anterior horn motor neuron clusters.

Cholinergic neurons can synthesize ACh when the target contact or synapse formation occurs. However, not all motor neurons in the spinal cord contain detectable ChAT protein. This observation was reported by Muroishi et al. in adult motor neurons (Muroishi et al., 2000). We have confirmed this finding in human fetal development and in neonates. The patchy expression of ChAT observed in the immunohistochemical analysis is attributable to variable activity of the enzyme in each individual neuron (Kato and Murashima, 1985). This suggests that the α -motor neurons of the human spinal cord express ChAT in a discontinuous manner. Therefore, ChAT appears focally accumulated in the perikaryon (Oda et al., 1995; Muroishi et al., 2000). In the present study, ChAT immunoreactivity was also found in dendrites and axons (predominantly in SMA samples). Indeed, there is some evidence that the synthesis of ACh takes place in the axonal terminals and is catalyzed by the enzyme ChAT (Van der Zee and Luiten, 1999).

From a quantitative point of view, RT-PCR at 15 weeks and Western analysis at 22 weeks showed a marked decrease in the total ChAT expression in the SMA spinal cord samples. However, Western blot analysis at 15 weeks in SMA showed normal levels of the ChAT 69 kDa protein. The lack of correlation between the levels of ChAT transcript and protein at 15 weeks was unexpected although this result was consistent in consecutive experiments. The stability of mRNA or protein is different from molecule to molecule and for reasons as yet unknown, the SMA ChAT transcripts might be less stable. In fact, the various ChAT transcripts could differ in stability and translation efficiency or could be differentially expressed in response to hormones or trophic factors (Resendes et al., 1999). Moreover, it is possible that RT-PCR is detecting reduced transcription in the disease state

while Western blot reflects protein made earlier in development.

It was not possible to observe morphological or pathological differences in fetal ChAT negative motor neurons analyzed by optic microscopy. However, all the observed postnatal SMA motor neurons with clear signs of chromatolysis were ChAT negative. As in normal development, the ChAT negative motor neurons in fetal SMA may reflect the absence of target contact. If motor neuron dysfunction were present in early SMA, a higher proportion of ChAT negative motor neurons would be expected with respect to age-matched samples. However, we found a similar proportion of ChAT positive and negative motor neurons in controls and SMA at 15 and 22 weeks, suggesting that dysfunction of the motor neurons is not the main cause of the lowered levels of ChAT expression detected at this stage. Between the 15th and the 22nd week there is a 20-35% reduction of neurons in the anterior horn of type I SMA fetuses (Soler-Botija et al., 2002), which is probably the cause of the reduced amount of ChAT expression detected in fetal SMA.

ChAT is encoded by a single gene located in chromosome 10q11.2 for which there are multiple transcripts expressed by alternative splicing of three exons. In humans, three transcripts translate to the same 69-kDa protein (transcripts R, N1 and N2). A fourth transcript, M, has two translation-initiation sites and yields an 82-kDa enzyme in addition to the 69-kDa form. The 82-kDa form differs from the 69 kDa ChAT in terms of a 118-residue N-terminal extension (Oda et al., 1992; Misawa et al., 1997). The predominant ChAT isoform is 69 kDa, which seems to be expressed in cytoplasm, whereas 82 kDa is detected in the nucleus and is unique to humans and primates (Resendes et al., 1999). We detected both isoforms although the protein stability of the largest isoform varied from sample to sample. The mechanisms regulating the production of the various transcripts as well as the physiological roles of the 82- and 69- kDa ChAT have not been elucidated.

Our results show that fetal SMA spinal cord expresses less ChAT although the proportion of positive/negative motor neurons is similar to that in controls, suggesting that the amount of ChAT and therefore, the cholinergic function in the surviving motor neurons should be normal. The differences in the expression could be attributed to the low number of motor neurons in SMA spinal cord. Moreover, the fetal SMA ChAT negative motor neurons provide no clear evidence of altered morphology although our results in neonates show that the degenerated motor neurons are negative for ChAT expression. This results support the idea that ChAT dysfunction is the consequence of and not a primary contributing factor toward motor neuron degeneration of SMA.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the consenting parents who made this study possible. We are indebted to Teresa Folip, Jose Luis Alvarez, Rosemary Arguelles, Victoria Cusí, Carmen Rodríguez, Juan Parra and María Amenedo for assistance in obtaining and preparing fetal

and postnatal human material. We would also like to thank Rosa Blanco, Rosa Rivera, Margarita Carmona, Berta Puig, Marta Barrachina and Isabel Domínguez for technical assistance and to Ignasi Gich for advice and help with the statistics.

REFERENCES

Biagioni, S., Tata, A.M., de Jaco, A., Augusti-Tocco, G. 2000. Acetylcholine synthesis and neuron differentiation. *Int. J. Dev. Biol.* 44, 689-697.

Bürglen, L., Seroz, T., Miniou, P., Lefebvre, S., Burlet, P., Munnich, A., Viegas-Pequignot, E., Egly, J.M., Melki, J. 1997. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIF, is involved in large-scales deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am. J. Hum. Genet.* 60, 72-79.

Carter, T.A., Bönnemann, C.G., Wang, C.H., Obici, S., Parano, E., de Fatima Bonaldo, M., Ross, B.M., Penchaszadeh, G.K., Mackenzie, A., Soares, M.B., Kunkel, L.M., Gilliam, T.C. 1997. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum. Mol. Genet.* 6, 229-239.

Clowry, G.J., Arnott, G.A., Clement-Jones, M., Fallah, Z., Gould, S., Wright, C. 2000. Changing pattern of expression of parvalbumin immunoreactivity during human fetal spinal cord development. *J. Comp. Neurol.* 423, 727-735.

Fidzianska, A., Rafalowska, J. 2002. Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol.* 104, 363-368.

Kato, T., Murashima, Y.L. 1985. Choline acetyltransferase activities in single motor neurons from vertebrate spinal cords. *J. Neurochem.* 3, 675-679.

Lefebvre, S., Bürglen, L., Beboutlet, S., Clermont, O., Burlet, P., Viollet, L., Benichou, B., Cruaud, C., Milasseau, P., Zeviani, M., Le Paslier, D., Frézai, J., Cohen, D., Weissenbach, J., Munnich, A., Melki, J. 1995. Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell.* 80, 155-165.

Mahoney, K., Vogel, W.H., Salvenmoser, F., Boehme, D.H. 1971. Activity of choline acetyltransferase in various human adult and fetal tissues. *J. Neurochem.* 18, 1357-1359.

Misawa, H., Matsuura, J., Oda, Y., Takahashi, R., Deguchi, T. 1997. Human choline acetyltransferase mRNA with different 5'-region produce a 69-kDa major translation product. *Mol. Brain Res.* 44, 323-333.

Muroishi, Y., Kasashima, I., Oda, Y. 2000. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of choline acetyltransferase in large motor neurons of the human spinal cord. *Histol. Histopathol.* 15, 689-696.

Nicholson, L.V.B., Davison, K., Falkous, G., Harwood, C., O'Donnell, E., Slater, C.R., Harris, J.B. 1989. Dystrophin in skeletal muscle. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J. Neurol. Sci.* 94, 125-136.

Oda, Y., Nakanishi, I., Deguchi, T. 1992. A complementary DNA for human choline acetyltransferase induces two forms of enzyme with different molecular weights in cultured cells. *Mol. Brain Res.* 16, 287-294.

Oda, Y., Imai, S., Nakanishi, I., Ichikawa, T., Deguchi, T. 1995. Immunohistochemical study on choline acetyltransferase in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Pathol. Int.* 45, 933-939.

Perry, E.K., Smith, C.J., Atack, J.R., Candy, J.M., Johnson, M., Robert, H.P. 1986. Neocortical cholinergic enzyme and receptor activities in the human fetal brain. *J. Neurochem.* 4, 1262-1269.

Phelps, P.E., Brennan, L.A., Vaughn, J.E. 1990. Generation pattern of immunocytochemically identified cholinergic neurons in rat brainstem. *Brain Res Dev. Brain Res.* 1, 63-74.

Resendes, M.C., Dobransky, T., Ferguson, S.S.G., Rylett, R.J. 1999. Nuclear localization of the 82-kDa form of human choline acetyltransferase. *J. Biol. Chem.* 274, 1917-1921.

Roy, N., Mahadevan, M.S., Mclean, M., Shutter, G., Yaraghi, Z., Farahani, R., Baird, S., Besner Johnston, A., Lefebvre, C., Kang, X., Salih, M., Aubry, H., Tamai, K., Guan, X., Ioannou, P., Crawford, T.O., de Jong, P.J., Surh, L., Ikeda, J.E., Korneluk, R.G., MacKenzie, A. 1995. The gene for neural apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 80, 167-178.

Scharf, J.M., Endrizzi, M.G., Wetter, A., Huang, S., Thompson, T.G., Zerres, K.,

Dietrich, W.F., Wirth, B., Kunkel, L.M. 1998. Identification of a candidate modifying gene for pinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat. Genet.* 20, 83-86.

Soler-Botija, C., Ferrer, I., Gich, I., Baiget, M., Tizzano, E.F. 2002. Neuronal death is enhanced and begins during fetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain.* 125, 1624-1634.

Soler-Botija, C., Ferrer, I., Alvarez, J.L., Baiget, M., Tizzano, E.F. 2003. Down-regulation of Bcl-2 proteins in type I SMA motor neurons during fetal development. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 420-426.

Vaca, K. 1988. The development of cholinergic neurons. *Brain Res.* 3, 261-286.

Van der Zee, E.A., Luiten, P.G.M. 1999. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog. Neurobiol.* 58, 409-471.

Wetts, R., Vaughn, J.E. 1996. Differential vulnerability of two subsets of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp. Neurol.* 141, 248-255.

Whitehouse, P.J., Price, D.L., Struble, R.G., Clark, A.W., Coyle, J.T., Delon, M.R. 1982. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science.* 215, 1237-1239.

Wu, D., Hersh, L.B. 1994. Choline acetyltransferase: celebrating its fiftieth year. *J. Neurochem* 5, 1653-1663.

TABLE 1 Motor neuron count according to the levels of ChAT expression in 15-week and 22-week fetuses.

ChAT expression	Control 15 weeks n=2		SMA 15 weeks n=3		Control 22 weeks n=1		SMA 22 Weeks n=1	
	(n)	%	(n)	%	(n)	%	(n)	%
++	147	22.5	226	18.1	48	13.6	31	14.9
+	147	22.5	410	32.8	100	28.3	56	26.9
-	358	54.9	614	49.1	205	58.1	121	58.2
Total	652		1250		353		208	

++ strong immunostaining, + weak immunostaining, - no immunostaining.

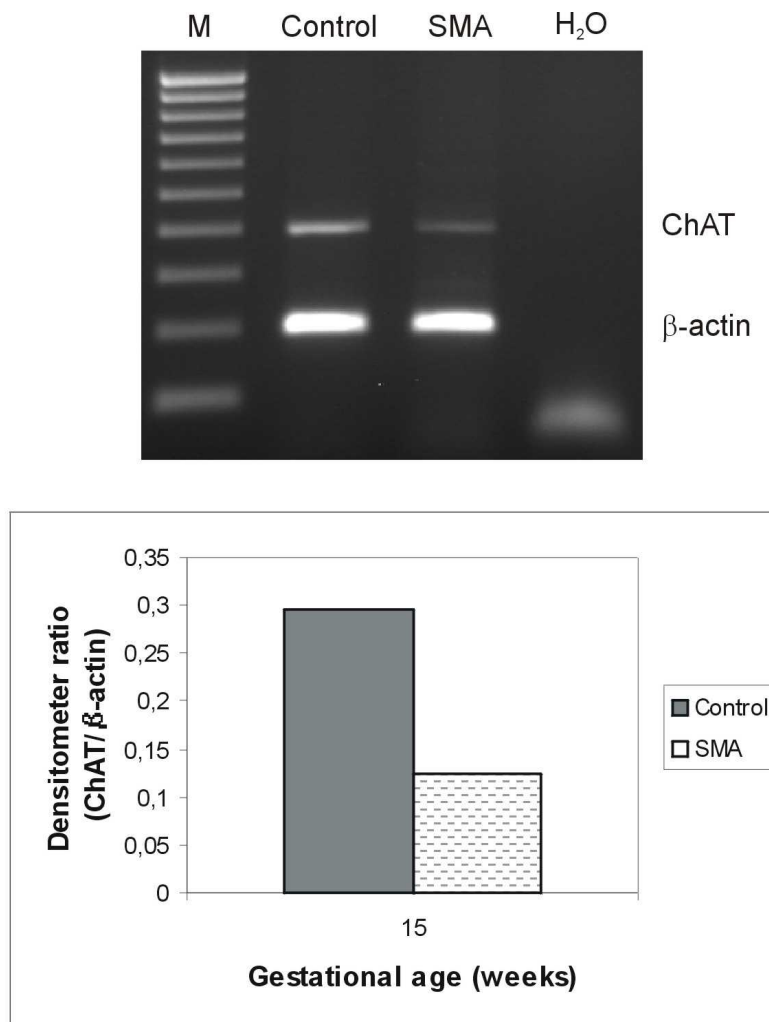
FIGURES

Figure 1. (A) RT-PCR analysis from total RNA extracted from a 15-week control and SMA fetal spinal cord. The 403 bp fragment includes exon 3 to 6 of the ChAT gene and the 200 bp fragment corresponds to the β-actin gene. (B) Histogram showing the ChAT/β-actin ratio of control and SMA samples. Control ratio was 0.30 whereas it was 0.13 in SMA. M=marker.

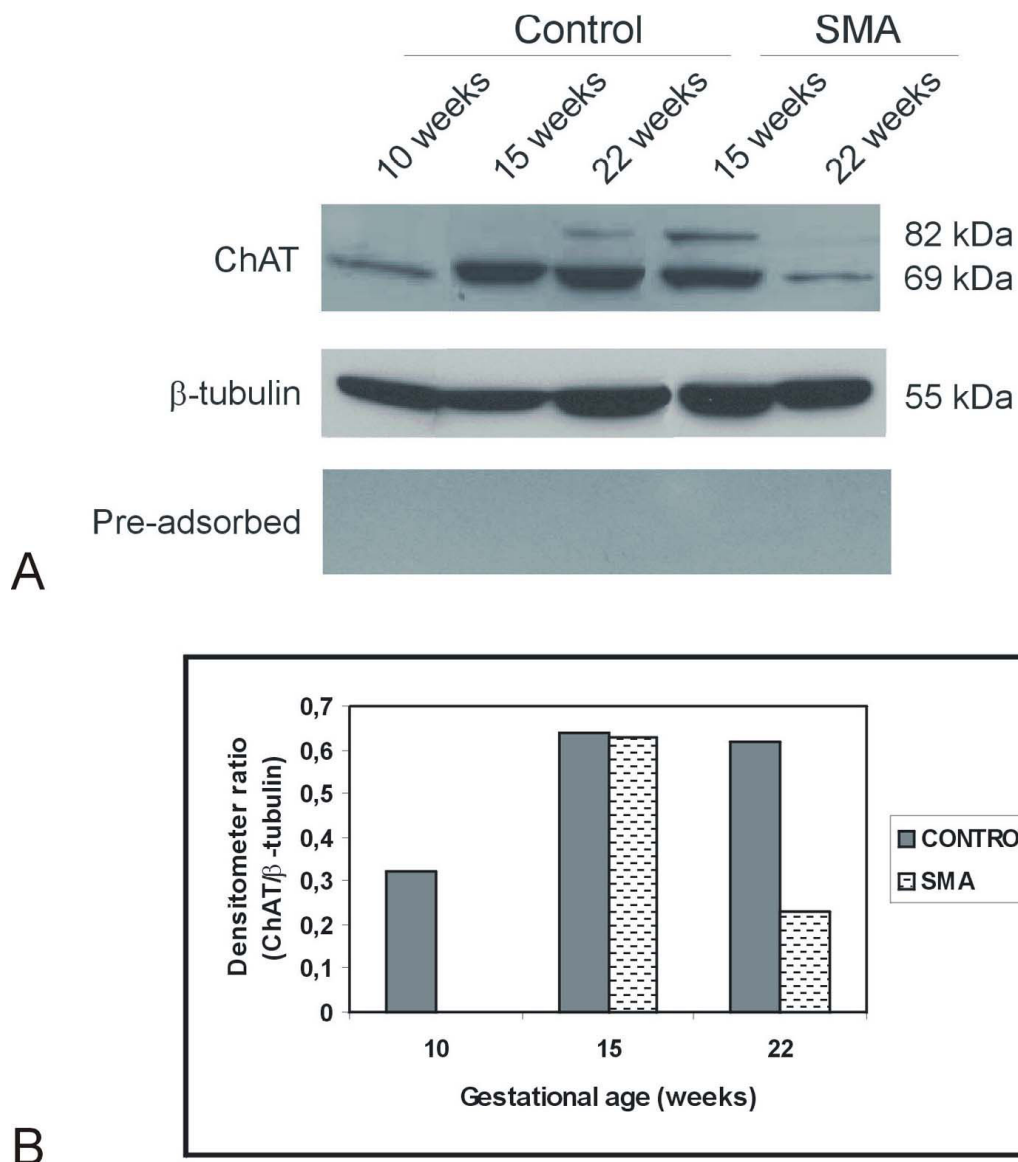


Figure 2. (A) Immunoblot showing the expression of ChAT at various developmental stages. Note the significant increase in the 69 kDa ChAT expression between 10 and 15 weeks in control samples, coincident with the period of more numerous target contacts or synapse formations. The 82 kDa isoform was predominantly detectable in SMA at 15 weeks and in controls at 22 weeks. The reduction in the amount of protein is seen in SMA at 22 weeks (B) Histogram showing the ChAT/ β -tubulin ratio of control and SMA samples. At 15 weeks the control ratio was 0.64 and the SMA was 0.63, whereas at 22 week the control ratio was 0.62 and the SMA was 0.23.

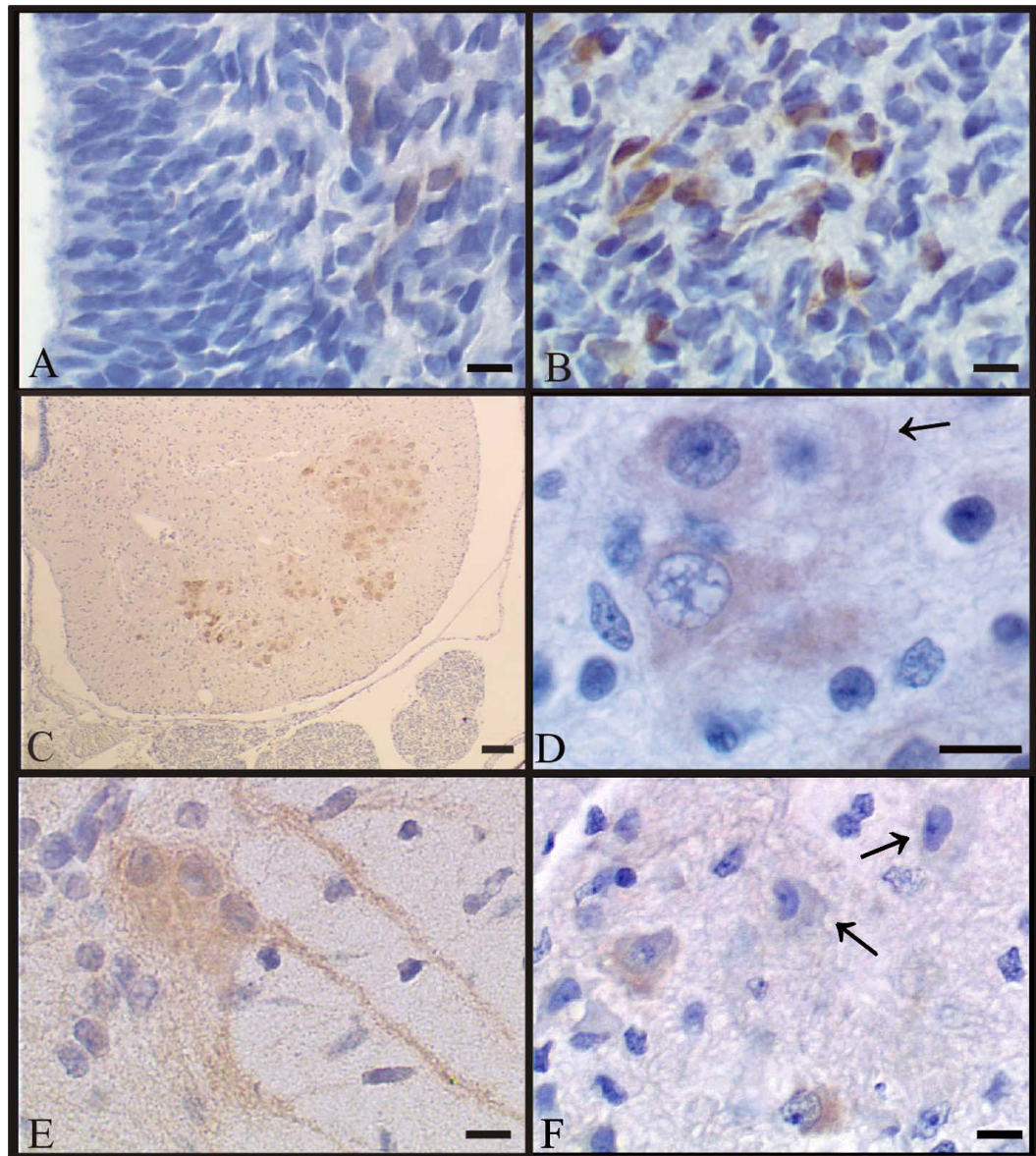


Figure 3. (A) Immunohistochemistry of fetal spinal cord. Panel A: 10-week control spinal cord showing sparse migrating neurons from the central canal with positive immunostaining. Panel B: 10-week control spinal cord showing positive cholinergic motor neurons of the anterior horn. Panel C: 18-week control spinal cord showing intense reactivity present in the medial and lateral anterior horn motor neuron clusters. Panel D: 15-week control motor neurons with positive and negative (arrow) cytoplasmic staining. Panel E: 15-week SMA showing the cytoplasmic positive staining of the motor neuron bodies and neuritic processes. Panel F: 15-week SMA showing the patchy expression in motor neurons. The negative ChAT motor neuron (upper arrow) show normal appearance. The weak motor neuron (lower arrow) appears with an eccentric nucleus. Scale bars= panels A, B, D-F: 10 μ m. Panel C: 100 μ m.

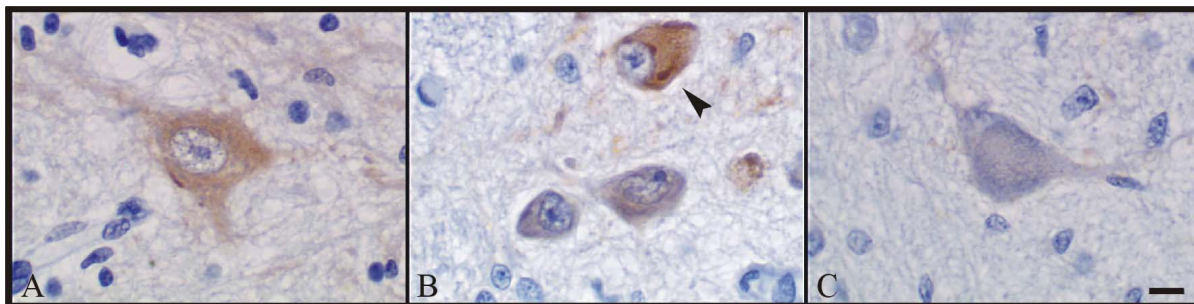


Figure 4. ChAT expression in neonatal motor neurons. (A) Control motor neuron (B) SMA motor neurons. Note the focal cytoplasmic expression (arrowhead). The eccentric nucleus may be a sign of early degeneration. (C) SMA motor neuron with important chromatolytic changes showing no expression of ChAT. Scale bar= 10 μ m

TREBALL 4

Implicacions de l'expressió de SMN2 en la patogènesi de l'Atròfia Muscular Espinal durant el desenvolupament

Implications of SMN2 expression in Spinal Muscular Atrophy pathogenesis during development

Brain Pathology, 2003 (sotmès; registre 13.67)

Un cop estudiades la mort neuronal i l'activitat colinèrgica de les neurones motores de la medul·la espinal, durant el desenvolupament control i AME, era lògic posar-se a analitzar quin era el patró d'expressió dels transcrits *SMN* i la seva proteïna en aquests fetus. En l'AME tipus I hi ha deleció homozigota del gen *SMN1*, però tots els pacients tenen una còpia altament homòloga, el gen *SMN2*. Tot i la homologia, aquest gen no és capaç de prevenir la malaltia, però produirà nivells baixos de la proteïna SMN, i permetrà que els individus arribin al període postnatal, morint posteriorment per problemes respiratoris. La majoria dels transcrits *SMN1* són sencers (*full-length; SMN FL*) i a una gran proporció dels transcrits *SMN2* els manca l'exó 7 ($\Delta 7$). El que encara no se sap és la regulació dels dos gens i de les proteïnes durant el desenvolupament, encara que sembla que existeix una major expressió de SMN durant el període fetal (Burlet P *et al.*, 1998; Fan L i Simard LR, 2002). En aquest treball, vam caracteritzar l'expressió de SMN2 durant el desenvolupament mitjançant una comparació sistemàtica de fetus control i AME. Això es va fer en teixits afectats per la malaltia, com són la medul·la espinal i el múscul esquelètic, i en d'altres no afectats. La medul·la espinal de fetus control mostrava els nivells més alts de *SMN FL*, amb un origen predominantment en *SMN1*. En canvi, als AME es va detectar una reducció de *SMN FL* i un augment de $\Delta 7$. Mitjançant la immunohistoquímica, es va poder observar que la proteïna SMN2 tenia un patró d'expressió tant temporal com espacial similar al de SMN1, tot i que els nivells eren menors a la medul·la espinal dels fetus AME. En canvi, a teixits no afectats per la malaltia com intestí, pulmó, glàndula adrenal, ronyó i ulls, l'expressió de SMN va ser prou similar als controls i als AME. En aquests teixits, SMN2 deu compensar l'absència de SMN1, mentre que a la medul·la espinal hi hauria una regulació més fina de SMN2 que comportaria l'aparició de la malaltia.

IMPLICATIONS OF SMN2 EXPRESSION IN SPINAL MUSCULAR ATROPHY PATHOGENESIS DURING DEVELOPMENT.

**Carolina Soler-Botija*, Ivón Cuscó*, Eva López,
Montserrat Baiget, Eduardo F Tizzano.**

Department of Genetics and Research Institute, Hospital Sant Pau, Barcelona.

Reprint requests and correspondence to:

Eduardo F. Tizzano, M.D., Ph.D. Genetics, Hospital de Sant Pau

Padre Claret 167, 08025, Barcelona, Spain.

Fax: 34-93-2919494,

tel: 34-93-2919361.

E-mail: etizzano@hsp.santpau.es

This work was funded by Telemarató TV3 Malalties Hereditaries 98-810, Premi Ferrer Salat and by FIS grants 00-0481 and 02-1275.

ABSTRACT

Spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the survival motor neuron gene 1 (SMN) that affects motor neurons. Although the SMN2 gene is the highly homologous SMN1 copy present in all patients, it cannot prevent the disease. It is well known that the SMN transcript is encoded by both genes, that most of the SMN1 transcript is full length (FL), that a substantial proportion of the SMN2 transcript lacks exon 7 ($\Delta 7$) and that SMA patients produce low levels of SMN protein from the SMN2. However, the development regulation of both genes and proteins remain unknown. In this paper we sought to characterize the expression of SMN2 during development by a systematic comparison between control and SMA fetuses. Control spinal cord revealed the highest level of FL SMN, all of which was virtually of SMN1 origin. Analyzing SMA spinal cord transcripts, we found a notorious reduction in the FL/ $\Delta 7$ ratios as a consequence of a decrease of the FL and an increase of $\Delta 7$ isoform. Employing immunohistochemistry, the SMN2 protein showed a similar temporal and spatial expression than SMN1 albeit to a lower degree in the SMA spinal cord. However, results of expression of SMN2 in other tissues not affected by the disease such as intestine, lung, adrenal gland, kidney and eye was similar in controls and SMA samples. In these tissues, SMN2 may compensate for the absence of SMN1 whereas in SMA motor neurons, a refined regulation of the SMN2 expression could favor the occurrence of the disease.

INTRODUCTION

Proximal spinal muscular atrophy (SMA) is an autosomal recessive disorder characterized by degeneration and loss of the α -motor neurons in the spinal cord, resulting in progressive muscular paralysis with atrophy. Childhood SMAs have been divided into three forms, based on the age of onset and clinical severity: type I (severe form, Werdnig-Hoffmann disease), type II (intermediate form) and type III (mild/moderate form, Kugelberg-Welander disease). Mutations in the telomeric survival motor neuron gene (*SMN1*) are responsible for SMA. The *SMN1* gene is duplicated with a highly homologous copy, *SMN2*, which may act as a phenotypic modifier of the disease (14, 4, 27, 7). SMA patients lacking *SMN2* have not been reported to date, suggesting that SMN plays an essential role during embryonic development. The SMN transcript is encoded by both genes, and SMA patients produce low levels of SMN protein from the *SMN2* gene (14, 15, 5). It has been reported that the sequence variations found in the *SMN1* and *SMN2* promoters do not predict differences in expression between both genes. Most of the *SMN1* transcripts are full length and a single nucleotide change in exon causes skipping of this exon in the majority of the *SMN2* transcripts (17, 18).

The SMN protein (38 kDa) appears ubiquitously expressed and is located diffusely in the cytoplasm and concentrated in aggregates called gems in the nucleus (16). SMN is part of a complex with various proteins involved in the splicing reaction (8). This apparent essential function for all cells appears critical for motor neurons when the levels of the SMN protein are reduced and the cells lack gems (5, 15).

In this paper, we compare the SMN expression pattern in control and SMA fetuses. Control samples represent the expression of both, *SMN1* and *SMN2* whereas SMA samples, because of the homozygous deletion of *SMN1* gene, express only the *SMN2* gene.

MATERIALS AND METHODS

Fetal specimens

The project was approved by the Ethics Committee and the Research Institute at the Hospital of Sant Pau and written consent from the family was obtained for each case. Control fetal material from first and second trimesters of gestation was obtained from elective terminations of pregnancy. Gestational age was determined by ultrasound measurements. Twenty fetuses with optimal tissue preservation were considered in the present study. Seven controls: 12 weeks (n=3) and 15 weeks (n=4), and 9 type I SMA specimens: 12 weeks (n=4) and 15 weeks (n=5) were processed for this work. SMA fetuses were obtained from abortions after confirmation of homozygous deletion of exons 7 and 8 of the *SMN* gene by chorionic villi DNA analysis (25). Five of these SMA cases (12 weeks=2; 15 weeks=3;) had a homozygous deletion of exon 5 of the neuronal apoptosis

inhibitory protein (NAIP), localized also in the SMA locus (21). Spinal cord, upper and lower limbs, tongue, heart, intestine, kidney, adrenal gland, lung, epidermis and eyes of each of the fetuses were isolated and processed for immunohistochemical analyses. RNA and protein for RT-PCR and western blotting experiments, respectively, were obtained from the spinal cord, skeletal muscle, kidney and fibroblasts from fetuses at 15 weeks' gestational age.

Fetal fibroblasts from control and type I SMA fetuses at 15 weeks' gestational age were extracted from a skin punch. Cells were disaggregated incubating the punch with 0.1% collagenase A (Boehringer Mannheim, Germany) overnight at 37°C. Then, cell suspension was plated and incubated until confluency with Dulbecco's Modified Eagle Medium containing 10% fetal calf serum, 1% Penicillin/Streptomycin (GIBCO, Life Technologies, Barcelona, Spain) at 37°C in a 5% CO₂ in air atmosphere.

RT-PCR

Spinal cords, skeletal muscle, kidney and fibroblasts from control and type I SMA fetuses at 15 weeks' gestational age were homogenized in 1 ml of TRIZOL reagent (Invitrogen Corporation, Barcelona, Spain) and processed according to the manufacturer's instructions. Total RNA was used as a template for the RT-PCR reaction. First -strand synthesis from the total RNA was carried out employing oligosT and MMLV reverse transcriptase (Invitrogene Corporation). The single stranded cDNA was PCR amplified using SMN exon 6 (541C618) (2) forward and exon 8 (541C1120) (14) reverse primers. To quantify the different transcripts, we coamplified the β -Actin gene (primers described previously in 12) in the same PCR reaction as an internal control, and then analyzed the ratio between the different isoforms (Full-Length transcript = 504bp; Transcript lacking exon 7 or $\Delta 7$ = 450bp).

The PCR reaction was performed in 25 μ l volume containing 0.8 μ M dNTPs, 1.5mM MgCl₂, and 1U *Taq* Polymerase (EcoGen, Barcelona, Spain). The amplification conditions were a total of 22 cycles (to ensure quantitative measurements during the linear phase), denaturation at 94°C for 1 min, annealing at 57°C for 1 min, and extension at 72°C for 1 min. The PCR products were electrophoresed and analyzed using 2% Nu-sieve agarose gels.

The RT-PCR amplified fragment (5 μ l) was then digested by the *Dde-I* restriction enzyme to determine the origin of the different transcripts. Only the products containing exon 8 of SMN2 were digested (25).

Immunoblot

Spinal cord, skeletal muscle, kidney and fibroblasts from control and type I SMA fetuses at 15 weeks' gestational age were used for immunoblot analysis. Tissue samples were

homogenized in Nicholson treatment buffer (125 mM TrisHCl, pH 6.8; 4% SDS; 4M urea; 5% mercaptoethanol; 10% glycerol, 0.001% bromophenol blue) (19). Fibroblasts were homogenized in blending buffer (4% sodium dodecyl sulfate (SDS), 62.5 mM Tris pH 6.8, 5 mM EDTA pH 6.8). The protein concentration of the samples were determined with a BCA kit (Pierce, Rockford, IL) according to the manufacturer's instructions, using BSA as standard. The protein homogenates were diluted in Laemmli sample buffer. Spinal cord, muscle, kidney and fibroblasts extracts were boiled for 5 minutes and then separated by SDS-PAGE with a mini-protean system (Bio-Rad, Madrid, Spain) with low range molecular weight standards (Bio-Rad). Protein analyzed on gel electrophoresis was electrotransferred onto nitrocellulose membranes (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany). The membranes were then washed with TRIS-buffered solution pH 7.4 and 0.1% Tween-20 (TTBS), and blocked with TTBS containing 5% skimmed milk and 1 % BSA for 60 min. The membranes were incubated overnight at 4°C with the mouse monoclonal anti-SMN antibody (Transduction Laboratories, Lexington, KY) at a dilution of 1:5000. After washing, the immunoblots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated anti-mouse secondary antibody (1:1000 dilution; DAKO, Barcelona, Spain) for 1 h at room temperature, washed again and developed with the SuperSignal Chemiluminiscent Substrate (Pierce). Stripping of the western blot and subsequent re-probing with a monoclonal anti- β -tubulin antibody showed equal loading of the gel for all the samples.

Densitometric analyses

RT-PCR and Western blot densitometric analyses were performed scanning and analyzing the SNM and β -actin band intensities using the imaging analyzer Scion Image (Scion Corporation, Frederick, MD) to calculate their ratios. The level of SMN relative to β -actin was determined by dividing the scanned density of SMN bands by the scanned density of β -actin for each lane.

Immunohistochemistry

Spinal cord, limbs, tongue, heart, intestine, kidney, lung, dermis and eyes of each fetus were immediately fixed by immersion with 4% paraformaldehyde, and embedded in paraffin. Transversal sections 5 μ m thick were mounted onto L-Lysine 50%-treated slides and stained with hematoxylin and eosin for morphologic analysis or processed for immunohistochemistry. De-waxed sections were processed for immunohistochemistry following the labelled streptavidin biotin method (LSAB kit peroxidase, DAKO). After blocking endogenous peroxidase with hydrogen peroxide and methanol, the sections were treated with sodium citrate buffer 10 mM pH6 for 25 minutes at 100°C and left overnight. Next, the sections were incubated with normal serum for 2 h at room temperature (1:20 dilution) and then incubated at 4°C overnight with a mouse monoclonal antibody SMN at

a dilution of 1:75 (Transduction Laboratories). As negative reaction controls, we incubated sections with the blocking solution. After the incubation, the sections were exposed to the biotinylated secondary antibody for 15 minutes, and finally to streptavidin-peroxidase for 15 minutes at room temperature (HRP Rabbit/Mouse/Goat Universal LSAB[®]+kit, DAKO). The peroxidase reaction was visualized with 0.05% diaminobenzidine (Sigma, Alcobendas, Madrid, Spain) and 0.01% hydrogen peroxide. The sections were slightly counterstained with hematoxylin.

RESULTS

Characterization of mRNA transcripts

Spinal cord, muscle and kidney. The RT-PCR analysis of SMN genes using primers 541C618-541C1120 and β actF- β actR showed transcripts consisting of 504bp, 450bp and 200bp corresponding to Full-length (FL) SMN, SMN Δ 7 and β -actin (Figure 1 A). Samples from control spinal cord revealed the highest level of FL SMN, all of which was virtually of SMN1 origin (FL SMN1=504bp, FL SMN2=381bp, SMN2 Δ 7=327bp) (Figure 1 B), followed by kidney and muscle, that showed lower levels (Figure 1 C). The levels of SMN Δ 7 were lower than FL SMN, but similar in the three control tissues. Samples from SMA fetal tissues showed a similar level of SMN FL and Δ 7 (from SMN2). All three SMA tissues showed a reduction of FL SMN transcript and an increase of SMN Δ 7 with respect to control samples, more notable in spinal cord (Figure 1 C).

The analysis between the two isoforms (FL/ Δ 7) demonstrated that control spinal cord had the highest ratio (2.3) and the greatest differences between control and affected fetal samples (Figure 1 D).

Fibroblasts. Fetal SMA fibroblasts showed a reduction of FL and SMN Δ 7 transcript with respect to controls (Figure 1 A -C). The analysis between the two isoforms (FL/ Δ 7) showed that control fibroblasts expressed a majority of FL transcript, most of them from the SMN1 gene whereas in SMA, the reduction of the FL/ Δ 7 is less notable with respect to the other tissues examined (Figure 1 C and D).

Immunoblot

Spinal cord, muscle and kidney. Immunoblot experiments using the monoclonal anti-SMN antibody showed expression of the SMN protein in control and type I SMA fetuses at 15 weeks' gestational age (Figure 2) although the expression of the SMA fetuses was weaker than in controls. In spinal cord, the SMN/ β -tubulin ratio in control fetus was 1.2 whereas in SMA it was 0.9 (25% reduction). The ratios of SMN/ β -tubulin in skeletal muscle were 1.3 for control fetuses and 1.2 for SMA (8% reduction) and in kidney were 1.06 for control and 0.87 for SMA (18% of reduction).

Fibroblasts. A notable differential SMN expression was detected between controls

(SMN/ β -tubulin ratio of 17) and SMA (SMN/ β -tubulin ratio of 1.2) (Figure 2).

Immunohistochemistry

Spinal cord. SMN expression was observed in all samples analyzed both in control and SMA. The expression was mainly detected in anterior horn motor neurons and dorsal root ganglia (Figure 3). Posterior horn cells and central canal epithelium showed a more patchy and weaker signal. Despite the significant expression in dorsal root ganglia, no categorical signal was detected in the peripheral nerves or axons, limiting the localization of SMN predominantly to the perikarion. In SMA spinal cord, SMN expression was weaker but present in anterior horn motor neurons, central canal epithelium and dorsal root ganglia (Figure 3). No immunostaining was detected in the SMA posterior horn cells (data not shown).

Muscle. At 12 and 15 weeks' gestational age, SMN expression was detected in the cytoplasm of myotubes and in the majority of their nuclei (Figure 4). A weaker signal was observed in the SMA muscle with very sparse nuclei expressing SMN. No apparent differences were found between upper and lower limbs and between proximal and distal segments (data not shown).

Other tissues. A strong immunostaining was detected in other tissues such as papilla and muscle fibers of the tongue, myocardial fibers, crypts of the intestine, proximal and distal convoluted tubules of the kidney, cells of the adrenal gland, primordial epithelium of the lung and retina (Figure 5). The signal was weaker in epidermis and endothelial cells of vessels (data not shown). In contrast to the situation of spinal cord and muscle, we were unable to distinguish significant differences between the expression of controls and SMA samples in all these tissues with the exception of the layer of rods and cones (patchy and lower expression in SMA).

DISCUSSION

We present a systematic study of the SMN2 expression in fetal SMA. We sought to characterize the temporal and spatial pattern of expression of the SMN mRNA isoforms and protein encoded by the SMN2 gene in two main affected tissues in SMA such as spinal cord and muscle, and to describe other tissues in which the absence of SMN1 seems to lack a clear pathology.

The FL SMN transcript seems to be almost exclusively dependent on the SMN1 gene in the spinal cord of control individuals at 15-week's gestational age. The contribution of the SMN2 expression to the amount of FL SMN seems to be greater in muscle and in non affected tissues like the kidney. These results suggest that SMN2 is less expressed in the spinal cord than in the muscle or kidney of control fetuses probably because of a favored

SMN1 expression. On the other hand, the amount of $\Delta 7$ in the SMA spinal cord is much higher than in controls despite the presence of a significant proportion of FL SMN. Gavrilov *et al.*, (11) analyzing human lymphoblastoid cell lines in patients with the three types of SMA, found that type I and II individuals produced significantly more alternative transcripts and fewer detectable FL transcripts than SMA type III and control individuals. These authors proposed a pathogenic role for SMN2 given that alternative SMN transcripts appears to be generated only from SMN2. Similar results were reported by Jong *et al.* (12). These investigators have found more transcripts containing exon 7 in tissues from an SMA fetus when compared with respect to lymphoblasts from SMA patients. In our work, a similar proportion of both transcripts was detected in the SMA fetal spinal cord, muscle and kidney. This suggests that SMN2 in fetal SMA may be overexpressed to compensate for the lack of SMN1. This overexpression may increase the $\Delta 7$ transcript (and potentially of its protein) in the spinal cord that usually express small amount of this. Given these results, a tissue specific factor may be determinant of SMA making the spinal cord more sensitive to the reduction of FL SMN and to the substantial increase in $\Delta 7$, suggesting that both are involved in the mechanism of the disease. In agreement with this hypothesis, Kerr *et al.*, (13) have published experimental results in rat neurons, showing a protective antiapoptotic effect of FL SMN and an acceleration of neuronal death with mutant SMN derivatives (such as SMN $\Delta 7$ or Y272C) from patients with SMA.

In this study we analyzed the expression of SMN protein using immunoblot and immunohistochemistry techniques. We found a decrease in the expression of the SMN protein in SMA spinal cord, muscle, kidney and fibroblasts in comparison with controls. The reduction was about 25% in the spinal cord whereas it was approximately 8% in muscle and 18% in kidney. By contrast, a more marked reduction was detected in cultured fibroblasts (93%). These notable differences could be attributed to the fact that the *in vivo* situation may not reflect the results of *in vitro* experiments with cultured cells. In fact, earlier studies in lymphoblastoid cell lines and fibroblasts from SMA patients have demonstrated a significant difference between the amount of protein detected by immunoblot experiments in comparison with controls (5, 15). This has also been reported in fetal tissues such as muscle (3). However, the fact that we did not detect such a difference in our experiments supports the hypothesis that SMA pathogenesis may result not only from the reduction in the total amount of protein but also from the influence of an unusual amount of SMN $\Delta 7$ in the spinal cord. SMN2 should give mainly a shorter protein with a different C-terminus. Different immunoblot experiments have failed to detect this truncated form. Moreover, the proportion of SMN $\Delta 7$ protein is very difficult to demonstrate in immunoblots of SMA tissues and cell lines, and the expression of this protein isoform is mainly deduced from the mRNA studies.

In an attempt to improve our understanding of the possible contribution of SMN2 to SMA pathogenesis, we investigated the distribution of the SMN protein in tissues from fetuses predicted to have SMA disease and in controls at two gestational ages. Our results showed a decrease in the expression of the SMN protein in SMA samples in the spinal cord but with a similar distribution. Thus, SMN2 has the same expression as SMN1 but to a lesser degree without significant differences in the two gestational ages analyzed (12 and 15 weeks). As in earlier *in situ* hybridization (20, 24) and protein studies (1, 15, 26, 9) a predominant positive SMN signal was detected in the cytoplasm of motor neurons from the fetal spinal cord. Williams et al. (26) reported that the expression of the SMN protein was very important in the nuclei from adult mouse skeletal muscle fibers. Our results in fetal human tissues showed the presence of SMN protein in both nuclei and cytoplasm of fetal myotubes. SMA samples showed a decrease in the level of expression and most of the nuclei displayed a lack of expression with a relative conservation of the cytoplasm staining. The influence of this differential expression in the muscle pathology reported in SMA is not known. Results in other control tissues such as heart, tongue, intestine, kidney, lung, and retina showed an important level of expression of SMN protein. Surprisingly, the amount and distribution of this SMN protein in SMA tissues were basically similar. As in the case of the spinal cord and the muscle, the distribution of SMN protein was not generalized but localized to some cell types. For example we found a high level of expression in the epithelia of the proximal and distal convoluted tubules of the kidney and cells of the adrenal gland which was the same as in the SMA kidney and adrenal gland. Similar results were found in the primordial epithelia of the developing lung, myocardial fibers, tongue, intestinal crypts and layer of ganglion cells of the retina. A weaker albeit substantial level of expression was found in epidermis and blood vessels, which was also similar in SMA tissues. At this point, we are unable to ascertain whether the SMN protein detected by immunohistochemistry is FL or is a different C- terminus protein given that a monoclonal antibody directed against exon 7 is not available. Assuming that both isoforms could be detected, the main conclusion of these results is that SMN2 appears to compensate for the normal level of expression in tissues not involved in the disease in fetal SMA. In contrast, spinal cord and muscle appear to suffer from quantitative and qualitative expression differences that increase their likelihood of being affected in SMA. Our results contrast with those of Burlet et al. (3), who reported no detectable immunostaining of the SMN protein in tissues from a type I SMA fetus such as kidney, thymus, lung and brain (3). We have not been able to account for this discrepancy although these authors have employed immunofluorescence methodologies mainly focusing in the detection of gems whereas our work was aimed at defining the distribution and localization of SMN positive cells.

Earlier SMN expression studies in the central nervous system showed a positive signal in structures that are not clearly related to SMA manifestations or pathology (i.e., ependymal cells, olive, cortical or cerebellar neurons) (24). These nervous cells, in addition to the cells of the several tissues analysed in this work, may be less sensitive to the absence or dysfunction of the SMN protein because of a compensation mechanism that could involve SMN2. In fact, a similar SMN level of expression in non pathologic SMA tissues with respect to controls favours the hypothesis of some kind of compensation by SMN2. This may prevent fetal death and damage to other tissues or organs. However, it is insufficient to avoid the onset of the disease. Moreover, in the spinal cord, SMN2 is not capable of producing the same amount of FL SMN although express an impressive increase in SMN Δ 7 that may be one of the factors responsible for the onset of the disease during fetal life. At this stage a significant increase in DNA fragmentation, suggesting a mechanism involving an alteration in programmed cell death during fetal development in type I SMA (10, 22) and appears to be the earliest finding of the disease. Moreover, a down regulation in expression of Bcl-2 and Bcl-XL proteins have been detected in SMA fetal spinal cords, consistent with a role for both proteins in the aberrant programmed cell death observed in type I SMA (23).

Our results highlight the importance of SMN2 as a putative contributor to the disease mechanism in SMA and to its possible role in compensating pathology in other tissues currently not affected in this disease. Further investigation should confirm whether SMN2 play a key role in the developmental mechanism of the disease. Confirmation of this hypothesis may have important implications for future therapeutic alternatives, especially those that involve upregulation of SMN2 in SMA patients.

ACKNOWLEDGMENTS

We wish to thank the consenting parents who made this study possible. We are indebted to Teresa Folip, Jose Luis Alvarez, Rosemary Arguelles, Victoria Cusí, Carmen Rodríguez, Juan Parra and María Amenedo for assistance in obtaining and preparing fetal human material. We would also like to thank Rosa Blanco, Rosa Rivera, Margarita Carmona, Berta Puig, Marta Barrachina and Isabel Domínguez for technical assistance and to Isidre Ferrer for helpful comments about the manuscript.

REFERENCES

1. Battaglia G, Princivale A, Forti F, Lizier C, Zeviani M (1997) Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet* 6: 1961-1971
2. Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J (1996) Structure and organization of the human survival motor neurone (SMN) gene. *Genomics* 32: 479-82
3. Burlet P, Huber C, Bertrand S, Ludosky MA, Zwaenepoel I, Clermont O, Roume J, Delezoide AL, Cartaud J, Munnich A, Lefebvre S (1998) The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 7: 1927-1933
4. Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davies K (1997) Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet* 61: 40-50
5. Coovert D, Le TT, McAndrew PE, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson SE, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AH (1997) The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet* 8: 1205-1214
6. Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J (1999) The promoters of the survival motor neuron gene (SMN) and its copy (SMNc) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet* 64: 1365-1370
7. Feldkötter M, Schwarzer V, Wirth R, Wienker TF, Wirth B (2002) 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
8. Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G (1997) The SMN-SIP1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell* 90: 1023-1029
9. Francis JW, Sandrock AW, Bhide PG, Vonsattel JP, Brown RH Jr (1998) Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 6492-6497

10. Fidzianska A, Rafalowska J (2002) Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol* 104: 363-368
11. Gavrillov DK, Shi X, Das K, Gilliam TC, Wang CH (1998) Differential *SMN2* expression associated with SMA severity. *Nat Genet* 20: 230-231
12. Jong YJ, Chang JG, Lin SP, Yang TY, Wang JC, Chang CP, Lee CC, Li H, Hsieh-Li HM, Tsai CH (2000) Analysis of the mRNA transcripts of the survival motor neuron (SMN) gene in the tissue of an SMA fetus and the peripheral blood mononuclear cells of normals, carriers and SMA patients. *J Neurol Sci* 173: 147-153
13. Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM (2000) Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 13312-13317
14. Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paskier D, Frézal J, Cohen D, Weissenbach J (1995) Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* 80: 155-165
15. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki, J (1997) Correlation between severity and SMN protein level in spinal muscular atrophy. *Nat Genet* 16: 265-269
16. Liu Q, Dreyfuss G (1996) A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J* 15: 3555-3565
17. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 6307-6311
18. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet* 8: 1177-1183

19. Nicholson LVB, Davison K, Falkous G, Harwood C, O'Donnell E, Slater CR, Harris JB (1989) Dystrophin in skeletal muscle. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci* 94: 125-136
20. Novelli G, Calza L, Amicucci P, Giardino L, Pozza M, Silani V, Pizzuti A, Gennarelli M, Piombo G, Capon F, Dallapiccola B (1997) Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues. *Biochem Mol Med* 61: 102-106
21. Roy N, Mahadevan MS, McLean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner-Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Ioannou P, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie A (1995) The gene for neuronal apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell* 80: 167-178
22. Soler-Botija C, Ferrer I, Gich I, Baiget M, Tizzano EF (2002) Neuronal death is enhanced and begins during foetal development in type I spinal muscular atrophy spinal cord. *Brain* 125: 1624-34
23. Soler-Botija C, Ferrer I, Alvarez JL, Baiget M, Tizzano EF (2003) Down-regulation of bcl-2 proteins in type I SMA motor neurons during fetal development. *J Neuropathol Exp Neurol* 62: 420-426
24. Tizzano EF, Cabot C, Baiget M (1998) Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system: implications for the pathogenesis of spinal muscular atrophy. *Am J Pathol* 153: 355-61
25. van der Steege G, Grootsholen PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CH (1995) PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet* 345: 985-986
26. Williams BY, Vinnakota S, Sawyer CA, Waldrep JC, Hamilton SL, Sarkar HK (1999) Differential subcellular localization of the survival motor neuron protein in spinal cord and skeletal muscle. *Biochem Biophys Res Commun* 254: 10-14
27. Wirth B (2000) An update of the mutation spectrum of the survival motor neuron gene (SMN1) in autosomal recessive spinal muscular atrophy (SMA). *Hum Mutat* 15: 228-237

FIGURES

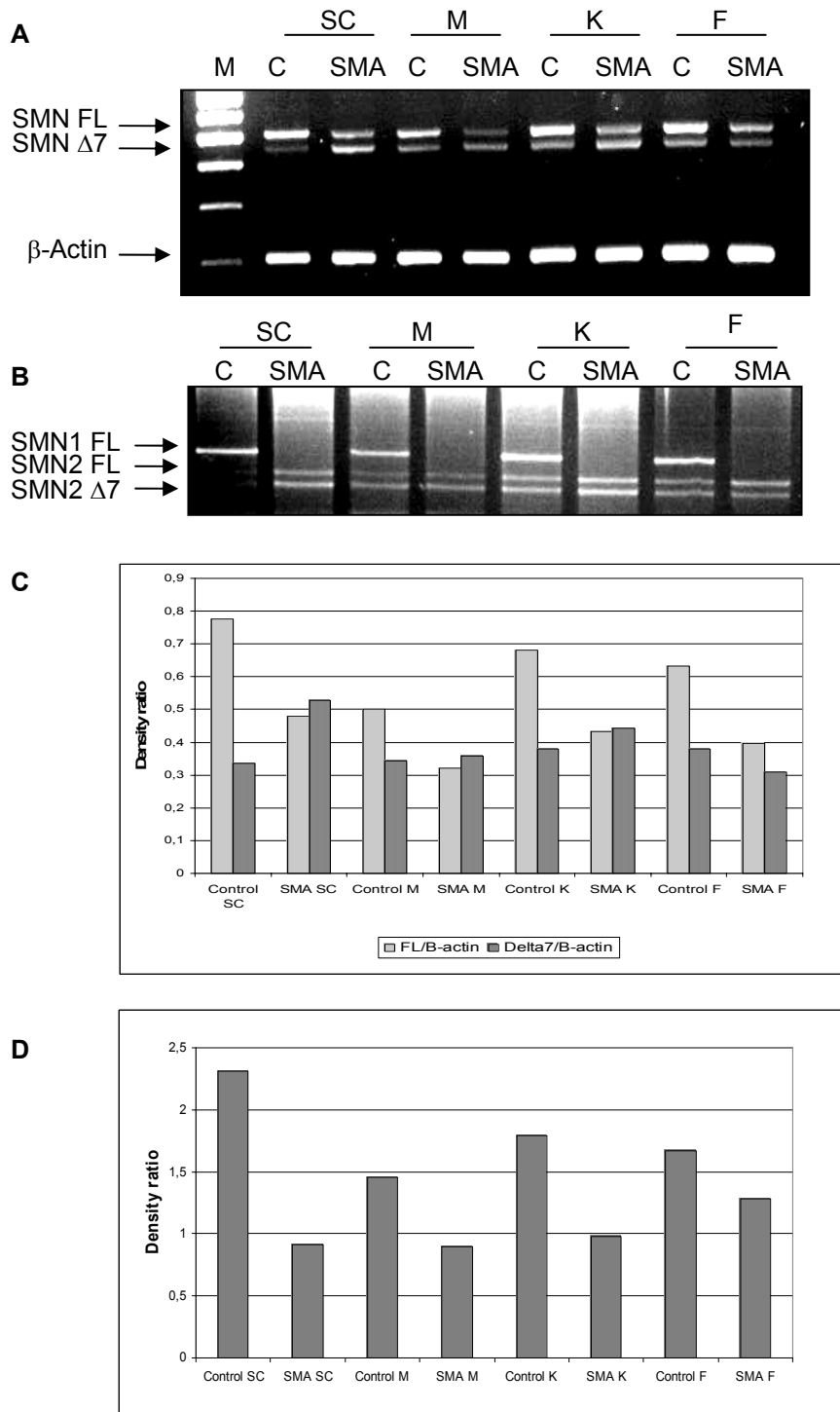


Figure 1. (A) RT-PCR analysis from total RNA extracted from a 15-week control (C) and SMA fetal spinal cord (SC), muscle (M), kidney (K) and fibroblasts (F). The 504 bp fragment includes exon 6 to 8 of the SMN gene. The 450 bp fragment includes exon 6 to 8 lacking exon 7 and the 200 bp fragment corresponds to the β -actin gene. (B) *Dde-I* digestion of the SMN RT-PCR amplified fragment to determine the origin of the different transcripts. (C) Histogram showing the densitometric FL/ β -actin and $\Delta 7$ / β -actin ratios and (D) the FL/ $\Delta 7$ ratios .

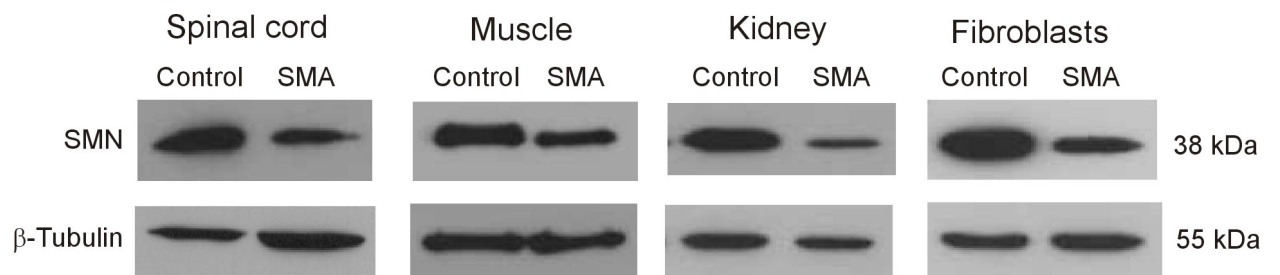


Figure 2. Immunoblot showing the SMN expression in spinal cord, muscle, kidney and fibroblasts at 15 weeks of gestational age. Note the lower FL protein amount expressed by SMN2 in the fetal SMA spinal cord, muscle and kidney.

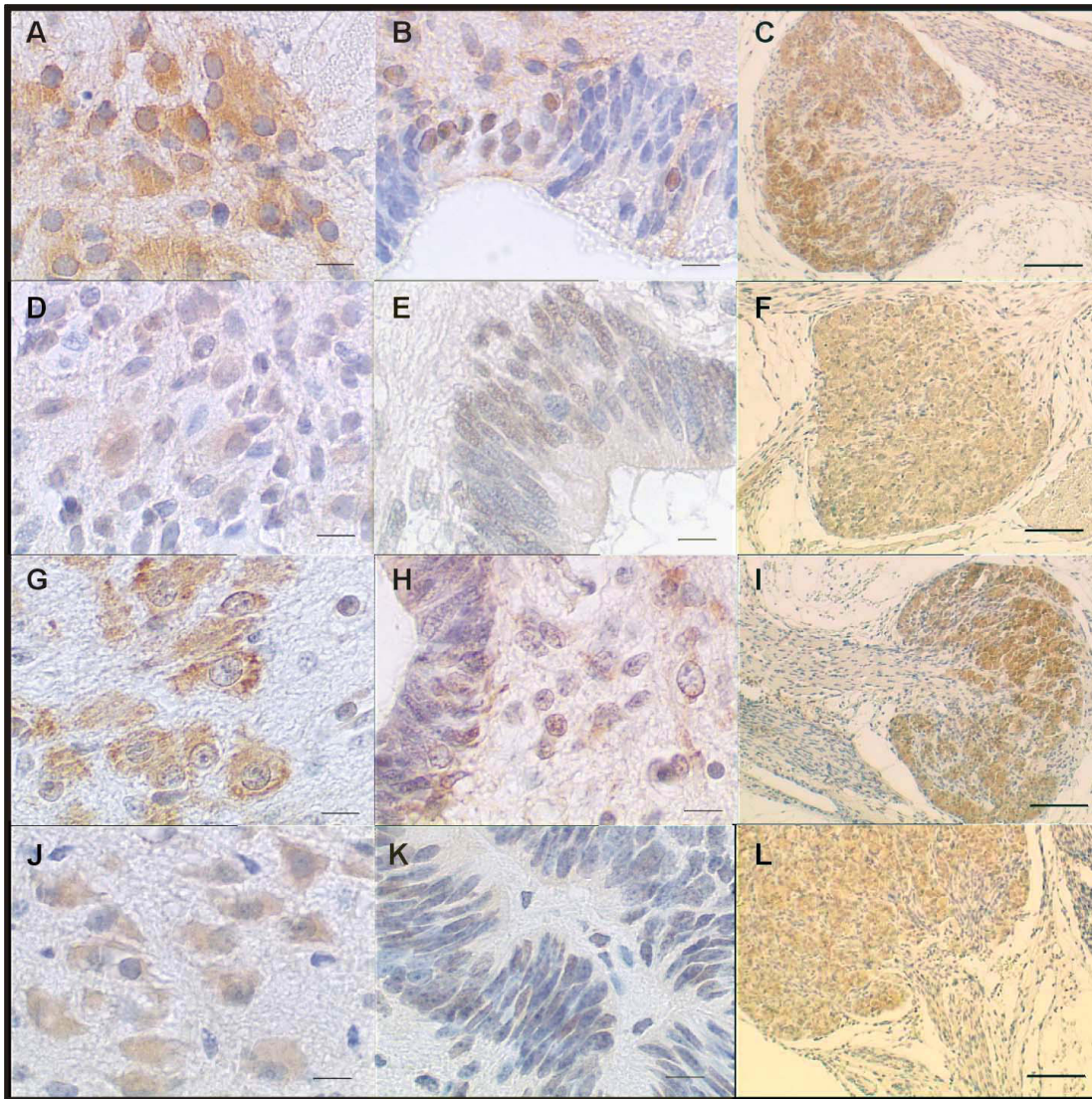


Figure 3. Immunohistochemistry of the fetal spinal cord. Panels A-C: 12-week control fetus. Note the positive immunostaining in anterior horns cells (A), epithelial cells of the central canal (B) and neurons of the dorsal root ganglia (DRG) (C). Panels D-F: 12-week SMA fetus. The positive immunostaining appears weaker in anterior horns cells (D), epithelial cells of the central canal (E) and DRG neurons (F). Panels G-I: 15-week control spinal cord showing a similar immunostaining than the 12-week sample in motor neurons from the anterior horn (G), and DRG (I). In central canal epithelium (H) the expression is more homogeneous and stronger than 12 week. Panels J-L: 15-week SMA spinal cord. Expression is reduced but present in the same structures motor neurons (J), epithelial cells of the central canal (K) and DRG (L). Scale bars= panels A, B, D, E, G, H, J and K: 10 μ m. Panels C, F, I and L: 100 μ m.

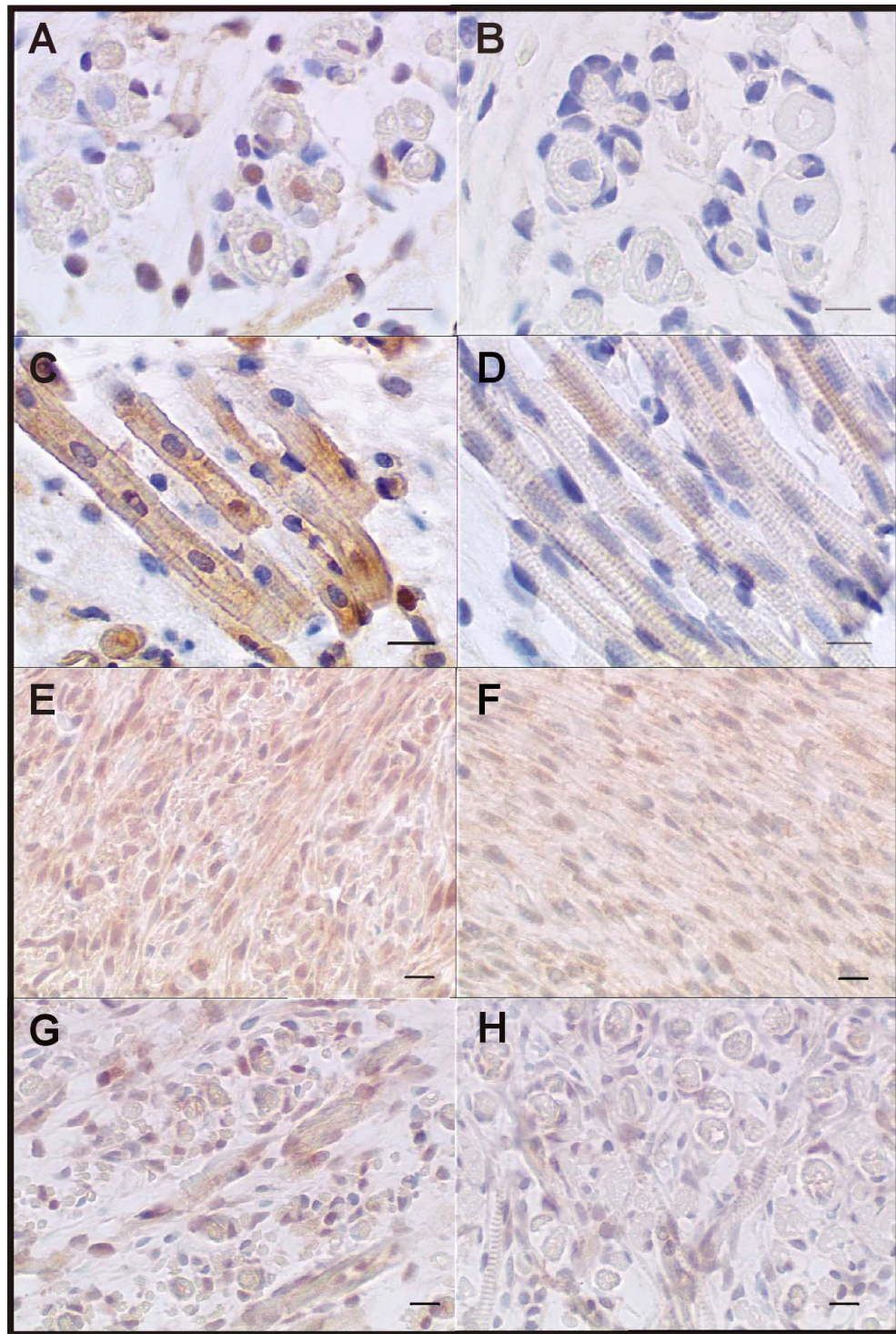


Figure 4. Immunohistochemistry of fetal muscle tissues. (A) 15-week control myotubes. (B) 15-week SMA myotubes. Note the lack of positive signal in nuclei and the reduced cytoplasmic immunostaining. (C) 15-week developmental control muscle fibers and (D) 15-week developmental SMA muscle fibers showing notably reduced expression of SMN. (E) 12-week control cardiac muscle. (F) 12-week SMA cardiac muscle. (G) 12-week control myotubes and fibers of the tongue. (H) 12-week SMA myotubes and fibers of the tongue. Scale bars= panels A-D: 10 μ m. Panels E-H: 100 μ m.

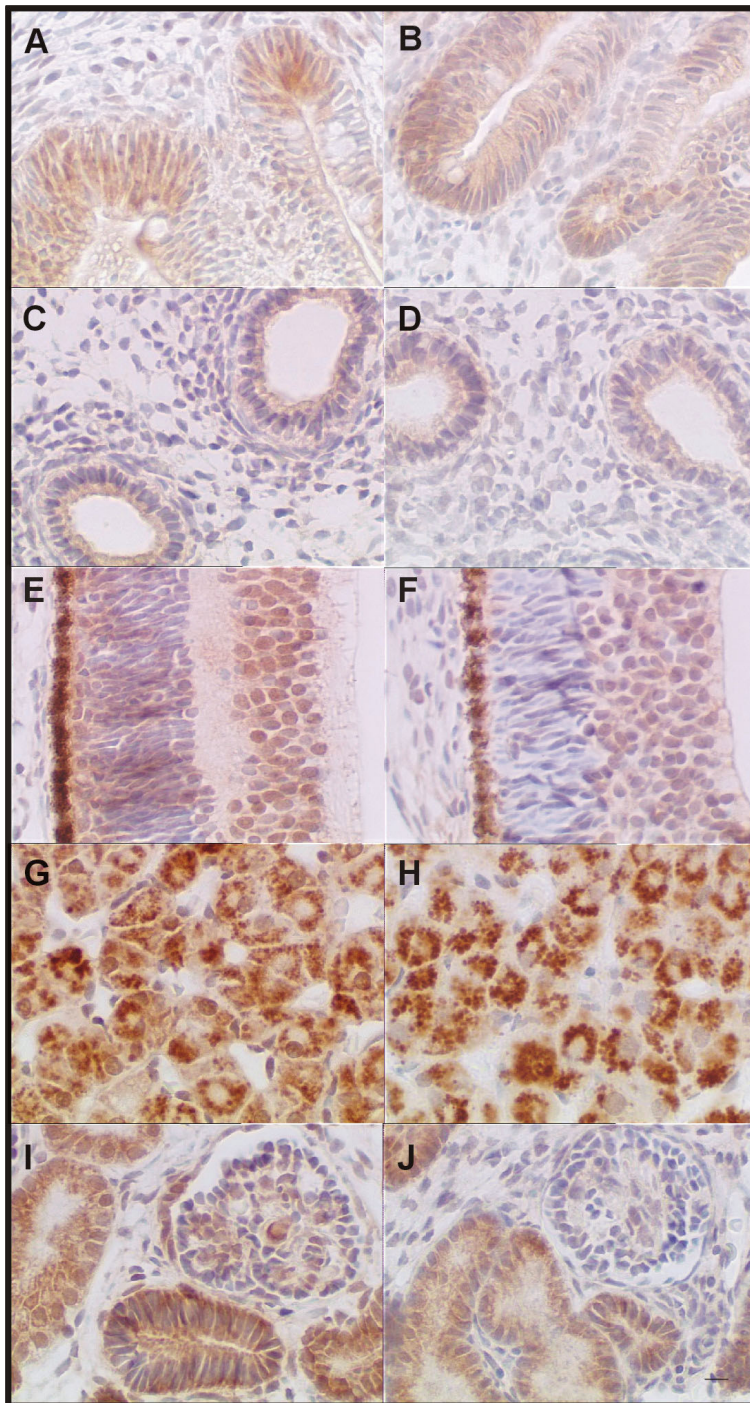


Figure 5. Immunohistochemistry of diverse fetal tissues. (A) 12-week control intestine and (B) 12-week SMA intestine. Note the similar positive expression in the cells of the crypts. (C) 15-week control primordial epithelium of the lung and (D) 15-week SMA lung. (E) 15-week control retina and (F) 15-week SMA retina. The ganglion layer shows similar expression but the rod and shapes layer shows reduced expression in SMA (G) 15-week adrenal gland cells and (H) 15-week SMA adrenal gland cells. (I) 15-week control kidney and (J) SMA 15-week SMA kidney. Both adrenal gland and kidney displayed a similar level of SMN expression. Scale bar= 100 μ m.

Discussió

En l'atròfia muscular espinal (AME) es dona degeneració i pèrdua de les neurones motores de la banya anterior de la medul·la espinal. Encara no se sap però, quin és el mecanisme que portarà a aquesta mort ni en quin moment comença. En aquesta tesi, hem volgut ajudar a esbrinar com s'inicia la malaltia i com progressa, en un estadi tan primerenc de la vida com és el fetal, i les primeres setmanes després del naixement. Per fer-ho, hem analitzat diferents aspectes, com la morfologia dels dos teixits principalment afectats (medul·la espinal i múscul esquelètic), la mort neuronal i de les fibres musculars i els seus possibles mecanismes, la funció colinèrgica i l'expressió del transcrit i la proteïna SMN.

Mort neuronal

En el sistema nerviós central, així com en altres teixits, es produeixen més cèl·lules de les que seran necessàries per a l'organisme, però aquestes s'eliminaran pel procés de mort cel·lular programada (revisat per Oppenheim RW, 1991). En el moment que ens vam plantejar el treball, sols s'havien fet estudis de mort cel·lular en fetus control. En un d'aquests estudis, van observar un pic de degeneració entre les 12 i les 16 setmanes de desenvolupament, amb una absència completa de cèl·lules picnòtiques després de la setmana 25 (Forger NG i Breedlove SM, 1987). D'acord amb els resultats comentats, en el nostre treball vam detectar una disminució en el nombre de neurones de la banya anterior de la medul·la espinal, entre les 10 i les 22 setmanes de gestació en fetus controls. A més a més, vam observar que els fetus AME tenien entre un 15 i un 35% menys de cèl·lules que els controls. Tot i la tendència dels fetus AME a tenir menys cèl·lules en totes les mostres analitzades, en fer l'anàlisi estadística no vàrem trobar diferències significatives entre els dos grups. Probablement això es deu a la combinació de dos factors, com són la variabilitat de la mesura, amb centenars de cèl·lules per secció, i el nombre limitat de mostres. Això podria baixar el poder estadístic de l'anàlisi.

Per altra banda, vam voler determinar quin era el mecanisme que portava a aquesta reducció en el nombre de cèl·lules, i per fer-ho es va utilitzar la tècnica de TUNEL. Aquesta tècnica detecta cèl·lules amb trencament del DNA amb extrems hidroxils a 3', i per tant, han entrat en un procés de mort. El que es va trobar a la banya anterior dels fetus AME, va ser un augment significatiu ($p < 0,0005$) en el nombre de cèl·lules que reaccionaven a la tècnica de TUNEL entre les 12 i les 15 setmanes de gestació. L'increment en el nombre de cèl·lules amb el seu DNA fragmentat en aquests fetus significa que, el procés natural d'apoptosi que ocorre durant el desenvolupament fetal es veu amplificat en el teixit afectat per la malaltia. Donat que el TUNEL també reacciona amb cèl·lules necròtiques amb el seu

DNA fragmentat, aquesta tècnica també podria estar detectant altres mecanismes de mort, com són la pròpia necrosi, la degeneració autofàgica o degeneració vesicular no lisosomal (Clarke PG, 1990). De tota manera, l'apoptosi està definida morfològicament per una condensació primerenca de la cromatina, i la formació de cossos apoptòtics, mentre que la necrosi es pot identificar per canvis en el citoplasma i el nucli. Així, la presència de cèl·lules apoptòtiques va ser identificada, en aquest treball, en base a característiques morfològiques i a una reactivitat per la tècnica de TUNEL.

Ja al 1983, Sarnat havia suggerit que el programa de mort neuronal estava malmès als individus amb AME, de manera que hi hauria una persistència o reactivació de la mort apoptòtica que es dona durant el desenvolupament normal (Sarnat HB, 1983). Les nostres observacions recolzen aquesta hipòtesi, ampliant els resultats al període fetal. Per altra banda, un estudi posterior realitzat també en fetus humans, reafirma les nostres troballes. En analitzar les mostres per microscòpia òptica i electrònica, van detectar una prolongació de la mort cel·lular als fetus AME comparat amb els control, de manera que en els primers, es detectava mort cel·lular fins la setmana 22 de desenvolupament. A més a més, mostraven anomalies nuclears als fetus afectes ja a les 16 setmanes de gestació. Aquests canvis progressaven a mida que els fetus AME s'anaven desenvolupant, i es podien considerar com els primers signes de degeneració de les neurones motores (Fidzianska A *et al.*, 2002). Aquestes observacions deuen ser degudes a l'absència o a un mal funcionament del gen *SMN1*. L'inici i manteniment del fenomen de mort podria estar modulats per altres factors, com l'efecte funcional que té el nombre de còpies de *SMN2*, el gen *NAIP* (Liston P *et al.*, 1996), certes mutacions derivades de pacients (*SMNΔ7*, Y272C) (Kerr DA *et al.*, 2000), o altres factors tant genètics com cel·lulars fins ara desconeguts. Més recentment, Vyas S *et al.* han demostrat que la proteïna SMN humana inhibeix la mort cel·lular a cèl·lules en cultiu amb inducció de l'apoptosi, actuant a través de la supressió de les vies apoptòtiques mitocondrials. En canvi, les formes de la proteïna $\Delta 7$, $\Delta 6/7$ i Y272C tenen un efecte proapoptòtic, de manera que demostren que l'extrem carboxi de la proteïna SMN és important per a la funció d'inhibició de la mort cel·lular (Vyas S *et al.*, 2002).

Una de les coses que no està tan clara és si l'apoptosi intervé en la progressió postnatal de la malaltia. En el nostre treball, durant el període postnatal no vam trobar cèl·lules positives per TUNEL i que alhora fossin immunoreactives per Hu, que és un marcador neuronal primerenc. La immunoreactivitat d'Hu s'ha demostrat fins i tot en els estadis més avançats de l'apoptosi (Ferrer I *et al.*, 1993). Les úniques cèl·lules TUNEL positives trobades postnatalment són Hu negatives, indicant que les cèl·lules que s'estan morint en aquest període tindrien un origen glial. Hayashi M *et al.* tampoc va trobar cèl·lules positives per TUNEL a medul·les espinals de pacients amb la malaltia de Werdnig-Hoffmann, tot i que sí les va detectar al nucli lateral del tàlem i, en un cas, també a l'escorça cerebral. No van confirmar però, que els pacients tinguessin deleció homozigota del gen

SMN (Hayashi M *et al.*, 1998). Hi ha un altre grup que va trobar resultats oposats als nostres. Detectaren cèl·lules apoptòtiques a la medul·la espinal de cinc nens amb AME tipus I, en aquest cas confirmat mitjançant anàlisi genètic. És estrany però que, en fer la tècnica de la fragmentació del DNA nuclear *in situ*, detectessin positivitat a neurones i cèl·lules de la glia normals, i en canvi, no a neurones cromatolítiques (Simic G *et al.*, 2000). Existeixen dos estudis que sí recolzen els nostres resultats, són els fets amb infants amb la malaltia de Wednig-Hoffmann (revisat per Ferrer I, 1996) i amb vedells Holstein-Friesian, també amb AME (Pumarola M *et al.*, 1997). En aquests treballs, es va fer servir la mateixa metodologia que la utilitzada per nosaltres per demostrar l'increment de cèl·lules apoptòtiques en el desenvolupament fetal de l'AME. Tots aquests resultat apunten a que, la mort de les neurones motores a l'AME tipus I es dona en gran mesura abans del naixement, en els estadis més primerencs de la malaltia, però progressa en el període perinatal probablement per un altre mecanisme diferent a l'apoptosi. Es podria especular però, que en les formes menys severes de la malaltia, les tipus II i III, es donaria aquest altre mecanisme de mort neuronal més tard en el desenvolupament o fins i tot després del naixement.

En fer el recompte del nombre de neurones dels nounats controls i dels AME, vam detectar una notable disminució dels valors en els afectes, presentant aquests una reducció d'un 57% respecte els control. Aquests resultats estan en concordança amb els observats per Simic G *et al.* en mostres postnatales, en les que la reducció en el nombres de neurones motores en pacients amb AME respecte els control va ser del 73% (Simic G *et al.* 2000). Pel que fa a la morfologia, amb la metodologia utilitzada no vam trobar diferències significatives a les neurones motores dels individus control i dels AME a nivell fetal. En canvi, en el període neonatal, vam observar cèl·lules amb el nucli excèntric i amb canvis cromatolítics primerencs. Tot i que s'ha considerat la pèrdua de les neurones motores com la característica neuropatològica més representativa de l'AME, les anomalies que es troben a les cèl·lules que no han mort poden ser un factor addicional que portarà a la denervació muscular.

En els últims anys, diferents grups han desenvolupat models de ratolí que imiten l'AME humana. Aquests animals no presenten duplicació del gen *SMN*, de manera que una inactivació homozigota del gen *Smn* portarà a una mort cel·lular massiva en els estadis primerencs del blastòcit (Schrank B *et al.*, 1997). S'han obtingut diferents models animals mitjançant diferents estratègies. Els grups de Hsieh-Li HM *et al.* i Monani UR *et al.* van crear ratolins amb un fenotip més o menys sever segons el nombre de còpies del gen *SMN2* que expressaven. Monani UR *et al.* van observar que la mort neuronal apareixia després del naixement, concretament en els últims estadis de la malaltia. Els ratolins que morien als 6 dies de néixer no mostraven canvis degeneratius a les neurones motores, ni tampoc cap signe de denervació del múscul esquelètic. Això es podria explicar amb la presència d'un procés degeneratiu agut als últims moments de vida. Hi havia però, ratolins que morien

molt poc després de néixer, per tant, els canvis degeneratius van haver de començar en el període fetal (Hsieh-Li HM *et al.*, 2000; Monani UR *et al.*, 2000a). Un altre model és el de Jablonka S *et al.*, en el que els ratolins eren heterozigots per *SMN* i amb signes de denervació o defecte motor. Després del naixement mostraven pèrdua de neurones espinals i facials fins als 6 mesos, i després s'aturava (Jablonka S *et al.*, 2000). El darrer dels models a comentar és el de Frugier T *et al.*, els quals van desenvolupar ratolins amb deleció de l'exó 7 a teixit nerviós, el que portarà a una AME tipus II i III, amb una reducció de l'esperança de vida. Les característiques fenotípiques que van observar van ser una denervació de la musculatura esquelètica severa amb canvis morfològics a les neurones motores. Els canvis observats en aquestes cèl·lules eren indentacions a la membrana nuclear i fragmentació del nucli. Els autors comenten que no s'han detectat aquests canvis en pacients amb AME, i probablement són manifestacions primerenques de la malaltia molt difícils de veure en humans, en els quals observem l'estadi terminal del procés. Per últim, tots aquests canvis portaran a la pèrdua de les neurones. Malgrat tot, no varen detectar cap disminució en el nombre de cèl·lules. El fet que els nuclis es vegin fragmentats, fa pensar que existeix un mecanisme de mort per apoptosi, però la pèrdua de les neurones motores en aquest model de ratolí es donarà de forma més tardana en la malaltia (Frugier T *et al.*, 2000). Aquesta hipòtesi estaria d'acord amb els nostres resultats pel que fa a l'augment de la mort neuronal detectada als fetus AME, encara que s'hauria d'ampliar l'estudi amb formes més lleus de la malaltia i determinar el moment en que es dona la pèrdua de les neurones.

Un cop analitzat l'increment de la mort per apoptosi de les neurones motores de la medul·la espinal als fetus AME tipus I, vam voler determinar quines eren les proteïnes que podien intervenir en aquest mecanisme de mort. Tres de les proteïnes candidates a estudi varen ser Bcl-2 i Bcl-X, ambdues proteïnes antiapoptòtiques, i Bax, una proteïna proapoptòtica. Així doncs, vam estudiar el patró d'expressió a fetus de 12 i 15 setmanes de gestació, tant en individus control com AME, i mitjançant la tècnica de Western blot i d'immunohistoquímica.

Pel que fa a les proteïnes Bcl-2 i Bcl-X analitzades als fetus control, vam observar que tenien un patró d'expressió diferent. Bcl-2 s'expressava predominantment a les neurones motores a les 12 setmanes de desenvolupament, i els nivells baixaven a les 15 setmanes. En canvi, a Bcl-X no es detectava una important expressió a les 12 setmanes, però a les 15 hi havia un increment (Figura 1). En estudis previs realitzats a fetus control entre 10 i 20 setmanes d'edat gestacional, van obtenir resultats similars (LeBrun DP *et al.*, 1993; Yachnis AT *et al.*, 1998). Aquest període coincideix amb un augment en la mort fisiològica de les neurones motores i amb l'establiment de les unions neuromusculars (Forger NG i Breedlove SM, 1987). Tant Bcl-2 com Bcl-X deuen ser necessàries per a la supervivència de les neurones postmitòtiques abans que s'hagin establert les connexions sinàptiques adients. Un cop han disminuït els nivells de Bcl-2, Bcl-X deu ser necessària per a que hi hagi

supervivència neuronal (Frankowski H *et al.*, 1995). La reducció de Bcl-2, observada a les neurones motores dels fetus control a les 15 setmanes, va aparèixer més aviat i en major grau als fetus AME, ja que en aquesta edat gestacional l'expressió és pràcticament nul·la. Per altra banda, Bcl-X actuaria de manera contrària endarrerint la seva expressió, essent poc uniforme a les neurones motores dels fetus afectes en aquesta edat. Així doncs, no podrà compensar la gran disminució de Bcl-2 en aquest període. Aquests resultats van ser confirmats per la tècnica de Western blot a les 15 setmanes, a on també s'observa la reducció en l'expressió d'ambdues proteïnes als fetus AME. Aquests resultats apunten a que part de la maquinària protectora de les neurones motores de la medul·la espinal està alterada, i la protecció que aporten aquestes dues proteïnes antiapoptòtiques és insuficient, de manera que això podria fer augmentar la susceptibilitat d'aquestes cèl·lules a una mort programada. El fet que no es detecti un increment de mort neuronal en els estadis més avançats del desenvolupament fetal, podria explicar-se pel progressiu augment en l'expressió de Bcl-X, tot i que és més tardà del que és als individus control.

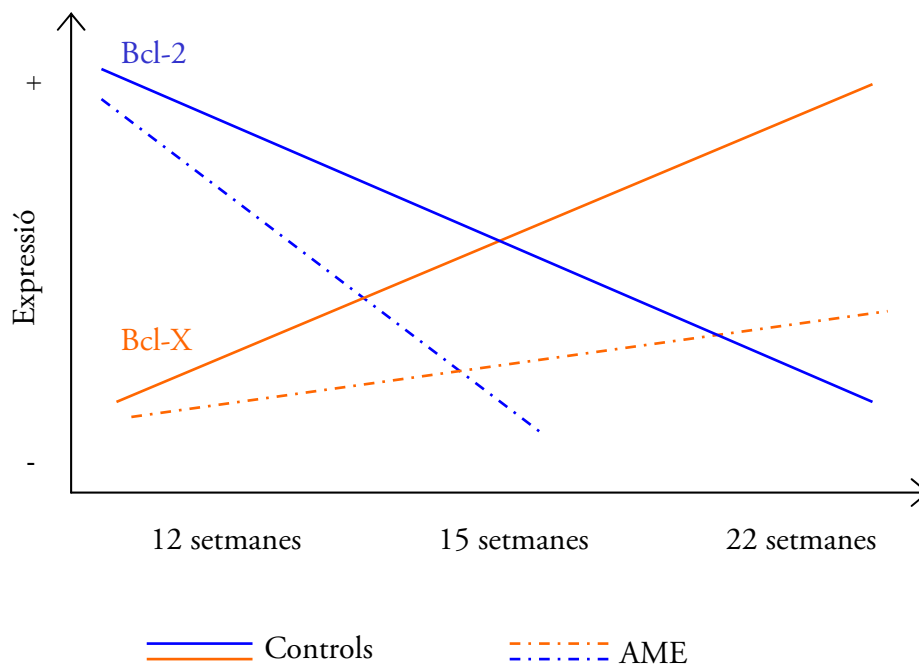


Figura 1. Esquema dels nivells d'expressió de les proteïnes Bcl-2 i Bcl-X durant el desenvolupament de fetus control i fetus amb AME. Les interseccions a les 15 setmanes mostren que els nivells a l'AME són molt més baixos que els control.

En un estudi previ realitzat per Simic G *et al.*, van observar una reducció dels nivells de Bcl-2 a les neurones motores de la medul·la espinal de pacients tipus I. Van suggerir que, la pèrdua d'expressió de Bcl-2 al citoplasma d'aquestes cèl·lules afavoria la seva mort per un

procés d'apoptosi (Simic G *et al.* 2000). Aquests resultats estan d'acord amb els que vam obtenir en els nostres treballs. Curiosament, tres dels fetus AME de 15 setmanes de gestació, utilitzats en els nostres estudis, tenien deleció homozigota del gen *NAIP*. Tot i que la causa exclusiva de l'AME se li atribueix a la pèrdua de funció de la proteïna SMN, és possible que la malaltia es vegi agreujada per l'increment en l'apoptosi degut a la manca de *NAIP*. Inicialment, aquest gen es va considerar com un possible gen modificador del fenotip patològic, tot i que la seva influència no ha estat demostrada (Roy N *et al.*, 1995). És per això que són necessaris més estudis en els que les mostres utilitzades tinguin al menys una còpia del gen *NAIP*, i poder analitzar si hi ha alguna diferència amb els individus que no l'expressen.

Anteriorment, ja s'havien realitzats estudis en els que s'analitzava la relació entre l'AME i la proteïna antiapoptòtica Bcl-2. En primer lloc, Iwahashi H *et al.* va demostrar que hi havia una certa interacció entre les proteïnes SMN i Bcl-2. Sembla ser que la unió de SMN i Bcl-2 es donava a regions que eren essencials per a la seva funció (Sato K *et al.*, 2000). La coexpressió d'ambdues proteïnes produïa un efecte sinèrgic preventiu quan hi havia apoptosi induïda per Bax, una proteïna que es veu inhibida quan Bcl-2 o altres proteïnes antiapoptòtiques s'hi uneixen. Les mutacions al gen *SMN* destruïen aquest sinèrgisme i per tant, segons els autors, això era el que portava a la patogènesi de l'AME. Proposaven que la pèrdua de funció tant de SMN com de NAIP eren les responsables de la mort neuronal en aquesta malaltia, de manera que la supervivència de les neurones estaria regulada per proteïnes antiapoptòtiques. Així doncs, aquests autors postulaven que SMN devia ser crucial només en aquelles cèl·lules amb una baixa expressió de Bcl-2 (Iwahashi H *et al.*, 1997). Això estaria en concordança amb els nostres resultats, ja que vam poder observar que a les arrels dorsals, als nervis perifèrics i a cèl·lules de la medul·la espinal diferents de neurones motores, l'expressió de Bcl-2 es mantenia per més temps. A més a més, les neurones motores que fossin capaces d'expressar Bcl-X, podrien prolongar la seva supervivència gràcies a la seva activitat antiapoptòtica tot i la manca de SMN. Altres autors estarien també d'acord amb les nostres observacions (revisat per Merry DE i Korsmeyer SJ, 1997; Yachnis AT *et al.*, 1998). Malgrat tot, hi ha grups treballant en el tema, que defensarien que no hi ha cap mena d'interacció entre la proteïna SMN i Bcl-2 (Coovert D *et al.*, 2000; La Bella V *et al.*, 2000). Cal comentar però, que podrien existir altres factors protectors que intervindrien en la supervivència de certs tipus de cèl·lules. S'ha suggerit que, el control de la mort cel·lular deu variar segons la procedència i l'estadi de desenvolupament de les cèl·lules, degut a que hi ha neurones que expressen diferents membres de la família Bcl-2 (Deckwerth TL *et al.*, 1996). Existeixen modificacions posttraduccionals que determinaran quin paper jugaran aquestes proteïnes en la regulació de l'apoptosi (revisat per Kroemer G, 1997). Així, és possible que les formes mutades de la proteïna SMN alterin la interacció entre aquesta i Bcl-2, i per tant s'interfereixin l'activitat antiapoptòtica

sinèrgica (Iwahashi H *et al.*, 1997). Els resultats apunten a que, tant la desregulació de Bcl-2 com de Bcl-X podrien jugar un paper en la patogènesi i el mecanisme de la malaltia en la medul·la espinal. És possible que això reflecteixi algun canvi específic de la neurona motora, produït per l'alteració de SMN i que secundàriament pugui afectar la regulació d'aquestes dues proteïnes.

En analitzar l'expressió de Bax, vam observar que aquesta era difusa a la medul·la espinal, excepte als ganglis de les arrels dorsals i als nervis perifèrics, no observant-se diferències entre els dos grups analitzats. Això concorda amb els resultats obtinguts en un estudi de mort cel·lular a teixit cerebral de pacients amb AME tipus I, a on no varen observar expressió de la proteïna Bax (Hayashi M *et al.*, 1998). De tota manera, no està del tot clar si el model de reostat mort-vida entre agonistes i antagonistes es pot considerar determinant de mort cel·lular (Oltvai ZN *et al.*, 1993). A part dels nivells d'expressió de les proteïnes pro- i antiapoptòtiques, és important veure si hi ha translocació o no de les proteïnes proapoptòtiques cap a la membrana mitocondrial (Zamzami N *et al.*, 1998). El fet de trobar uns nivells elevats de Bax no seria una garantia de que estigués actuant en el mecanisme de mort cel·lular, però la seva translocació a mitocòndria, i la posterior formació del porus transmembrana, sí ho seria. L'expressió basal de Bax trobada en els nostres experiments, ens indicaria que aquesta proteïna no tindria una intervenció directa en el mecanisme de mort neuronal que es dona als fetus amb AME. Curiosament però, a tots els fetus tant control com AME, hi havia una elevada expressió de Bax als ganglis de les arrels dorsals i als nervis perifèrics, sense diferències entre els control i els afectes. L'expressió de Bax a cèl·lules madures i immadures dels ganglis de les arrels dorsals va ser descrita per Vogelbaum MA al 1998. Mostraven una major expressió de la proteïna a cèl·lules immadures que a les madures, suggerint així la participació de Bax en el procés de mort en aquestes estructures (Vogelbaum MA *et al.*, 1998). Segons els nostres resultats, també podríem suggerir que Bax estaria actuant en el procés de mort cel·lular programada que es dona en el desenvolupament fetal en aquests teixits. A més a més, s'han descrit nivells alts de la proteïna durant les últimes etapes del desenvolupament i en les primeres setmanes de vida en cervell de rata (Vekrellis K *et al.*, 1997; Shimohama S *et al.*, 1998). Aquests autors suggereixen que, els diferents senyals que induïxen la mort neuronal modularan els nivells de Bax. Això explicaria les diferències trobades en el patró d'expressió a les estructures analitzades en el nostre estudi.

D'acord amb totes aquestes observacions de mort cel·lular en la AME, la identificació de factors addicionals de supervivència o potenciadors de l'apoptosi, així com la identificació del paper de SMN, de gens modificadors o d'altres factors en aquest procés, podrien ajudar en la recerca d'una teràpia primerenca de la malaltia.

Funció colinèrgica

En els treballs realitzats fins al moment, vam poder veure que ja en el període fetal es començava a percebre la pèrdua de les neurones motores als individus amb AME. Ara bé, ens podem preguntar si és l'alteració de la funcionalitat de les neurones la que provocarà la seva mort, o aquestes són funcionals i moren per altres causes. I també, tenen activitat colinèrgica les neurones que sobreviuen? Per ajudar a esbrinar aquest aspecte, vam fer un estudi sistemàtic del patró d'expressió de la colina acetiltransferasa (ChAT) a la medul·la espinal de fetus i nounats tant control com AME. La ChAT és l'enzim que catalitza la síntesi de l'acetilcolina (ACh), el neurotransmissor que donarà a les cèl·lules la seva activitat colinèrgica, i per tant, ens reflectirà l'estat funcional de la neurona. Als fetus control d'entre 10 i 22 setmanes d'edat gestacional, vam observar un augment progressiu de l'expressió de la ChAT. Clowry GJ *et al.* van trobar resultats similars en un estudi realitzat amb fetus d'entre 11 i 14 setmanes de desenvolupament (Clowry GJ *et al.*, 2000). Pel que fa als individus amb AME, el patró d'expressió que vàrem trobar va ser molt similar al dels control, amb una expressió més marcada de ChAT a les dendrites i als axons als fetus AME de 15 setmanes.

La ChAT es comença a sintetitzar molt aviat en el desenvolupament. A l'estadi de gàstrula o nèurula, ja hi ha una predisposició de les neurones motores i algunes cèl·lules de la cresta neural al fenotip colinèrgic. L'expressió colinèrgica es fa evident quan s'atura la divisió cel·lular. Això fa pensar que aquest enzim pugui jugar un paper en la posterior diferenciació cel·lular i en la interacció amb les cèl·lules diana. Les neurones colinèrgiques podran sintetitzar ACh durant el procés de migració, i alliberar-la des del conus de creixement abans que la sinapsi s'hagi format. S'ha vist que l'ACh juga un paper important com a modulador de la diferenciació neuronal. El fenotip colinèrgic es pot modificar o revertir durant el període en que encara no s'ha donat la interacció de la neurona amb el teixit. A partir de llavors, ja no hi ha marxa enrera (revisat per Vaca K, 1988 i Biagioni S *et al.*, 2000). En el nostre estudi, vam trobar immunoreactivitat per la ChAT a certes neurones migratòries de medul·les espinals a les 10 setmanes de gestació. En estadis més avançats de desenvolupament, les cèl·lules que presentaven una reactivitat més intensa eren les dels grups de neurones motores lateral i intermedi de la banya anterior. Aquests resultats estan en certa concordança amb els trobats a rata, a on s'ha descrit també l'expressió de la ChAT a neurones premigratòries i migratòries primerenques de la medul·la espinal (Phelps PE *et al.*, 1990). És important remarcar que no totes les neurones de la medul·la espinal contenen nivells de ChAT que es puguin detectar. Aquestes poden sintetitzar l'acetilcolina quan es dona el contacte amb la cèl·lula diana o es forma la sinapsi. Muroishi Y *et al.* va fer aquestes observacions a neurones motores adultes, i nosaltres vam confirmar aquests

resultats al desenvolupament fetal i a nounats (Muroishi Y *et al.*, 2000). Observàrem una expressió desigual a les neurones motores, que es pot atribuir a l'activitat variable de l'enzim a cada cèl·lula individual (Kato T i Murashima YL, 1985). Això suggereix que les neurones motores α de la medul·la espinal expressen la ChAT d'una manera discontinua. Així, l'enzim apareix acumulat focalment al pericarió (Oda Y *et al.*, 1995; Muroishi Y *et al.*, 2000). Tot i així, les nostres observacions apunten a que també hi ha immunoreactivitat per la ChAT a les dendrites i a alguns axons, predominantment a les mostres amb AME. De fet, hi ha algunes evidències de que la síntesi de l'acetilcolina té lloc a les terminacions axonals, essent la reacció catalitzada per la ChAT (van der Zee EA i Luiten PG, 1999).

Per tal de comparar l'expressió total de la ChAT a individus control amb l'observada als afectes, vam realitzar la tècnica de RT-PCR a medul·les espinals de fetus de 15 setmanes de gestació. D'aquesta manera vam poder fer una semiquantificació dels nivells de transcripció dels dos tipus de mostres, a on vam observar una clara disminució en els nivells d'expressió de la ChAT als individus AME. Aquests resultats es van veure corroborats amb la tècnica de Western blot, però en aquest cas la disminució de proteïna es donava als individus AME de 22 setmanes de desenvolupament, presentant uns nivells comparables als controls de la isoforma de 69 kDa a les 15 setmanes. Aquesta falta de correlació entre els nivells de transcrit i de proteïna, tot i no ser d'esperar, es va repetir a successius experiments. Una possible explicació d'aquest fet podria ser la diferent estabilitat del mRNA i la proteïna, essent els transcrits de ChAT menys estables als individus AME. S'ha suggerit també que hi podria haver una variació en l'estabilitat i l'eficiència transcripcional de la ChAT, així com una diferent expressió en resposta a hormones o factors tròfics (Resendes MC *et al.*, 1999). A més a més, la baixa quantitat de RNA a les 15 setmanes pot ser el resultat d'una menor transcripció deguda a la patologia, mentre que el Western blot ens reflectirà els nivells de proteïna produïda abans en el desenvolupament.

En analitzar les neurones motores fetals que no immunoreaccionaven per la ChAT, vam observar que no presentaven diferències morfològiques o patològiques a nivell de microscòpia òptica. En canvi, en analitzar els nounats AME, vam veure que totes les neurones motores que presentaven signes clars de degeneració no expressaven la ChAT. La manca d'expressió en algunes neurones als fetus AME reflectirà l'absència del contacte amb la cèl·lula diana, tal com passa en el desenvolupament dels individus control. Si existís una disfunció neuronal motora en els estadis fetals de l'AME, observariem una major proporció de neurones negatives per la ChAT. En canvi, varem trobar una proporció similar de neurones motores positives i negatives pel que fa a l'expressió de la ChAT als individus control i AME a les 15 i 22 setmanes. Això ens suggereix que la disfunció d'aquestes cèl·lules no seria la causa principal dels baixos nivells d'expressió de la ChAT detectats en aquest estadi. La reducció d'un 20-35% en el nombre de neurones entre les setmanes 15 i

22 de gestació als individus AME en comparació amb els controls, probablement explica la disminució en l'expressió de ChAT.

La ChAT és un enzim que s'expressa en diferents isoformes. Aquestes es traduiran en una proteïna de 69 ó 82 kDa. La diferència entre ambdues isoformes resideix en una extensió de 118 residus a la regió N-terminal a la isoforma de 82 kDa (Oda Y *et al.*, 1992; Misawa H *et al.*, 1997). De les dues, la isoforma de ChAT que predomina més és la de 69 kDa, que s'expressa al citoplasma, mentre que la de 82 kDa es troba al nucli, essent única a primats, humans inclosos (Resendes MC *et al.*, 1999). En aquest treball, vàrem detectar ambdues isoformes, tot i que l'estabilitat de la més gran va variar d'una mostra a l'altra. Això és difícil d'explicar degut a que no es coneixen els mecanismes que regulen la producció dels diferents transcrits ni el rol fisiològic de les dues isoformes.

En resum, els resultats obtinguts en aquest treball, ens han permès veure que, malgrat la pèrdua de neurones motores a la medul·la espinal als afectes, les que romanen vives mantindrien la funcionalitat colinèrgica, cosa que encoratjaria a seguir en la recerca d'un tractament que aturés el procés de mort i degeneració neuronal.

Desenvolupament muscular

El múscul esquelètic és un dels teixits principalment afectats en l'AME. És per això que, a banda d'estudiar la medul·la espinal, vam trobar important analitzar també el teixit muscular. Així, podríem ajudar a tenir una visió més àmplia dels mecanismes que intervindrien en l'atròfia de les fibres musculars als individus AME.

En primer lloc, vam fer una anàlisi morfològica de les extremitats superiors i inferiors de fetus control i AME de 12 i 15 setmanes de gestació. Contràriament als resultats obtinguts al teixit neuronal, al múscul esquelètic fetal sí vàrem detectar algunes anomalies morfològiques. Principalment, al teixit afecte s'observava un retard en el desenvolupament dels miotubs, presentant diferents mides però amb abundància dels petits, i amb una distribució agrupada dels que tenien una mida semblant. Aquestes observacions estan en concordança amb les realitzades en biòpsies musculars de pacients amb AME, a on les fibres musculars atròfiques es presentaven agrupades, i el nombre de fibres de cada grup augmentava amb la severitat de la denervació (Fidzanska-Dolot A i Hausmanowa-Petrusewicz I, 1984). Els mateixos autors havien publicat l'observació de cèl·lules immadures i amb aparença de miotubs a pacients amb AME tipus I. Tot això indica que existiria un procés de miogènesi retardada, que els nostres resultats confirmen que es manifesta ja durant el desenvolupament fetal (Hausmanowa-Petrusewicz I i Fidzianska A, 1974). Encara més, també van trobar fibres musculars immadures a pacients

amb Kugelberg-Welander, suggerint que a les formes cròniques també existiran defectes en el desenvolupament muscular (Hausmanowa-Petrusewicz I *et al.*, 1980). Per altra banda, és conegut que durant la miogènesi del múscul esquelètic normal es produeix mort cel·lular per apoptosi (revisat per Sandri M i Carraro U, 1999). En el nostre estudi, així com a la medul·la espinal vam detectar un increment en la mort neuronal durant el desenvolupament dels fetus AME, al teixit muscular no vam observar aquesta diferència en utilitzar la tècnica de TUNEL. Els estudis reportats anteriorment a múscul postnatal mostren una certa controvèrsia. Per una banda, Fidzianska A *et al.* van proposar l'apoptosi al múscul esquelètic com un possible mecanisme patològic en l'AME. Observaven una reducció important de cèl·lules musculars deguda a l'apoptosi, en un pacient amb AME de 8 setmanes d'edat. Proposaven que, l'eliminació de les fibres musculars, dianes de les cèl·lules de la banya anterior de la medul·la espinal, resultava en una mort neuronal secundària (Fidzianska A *et al.*, 1990). Malgrat tot, hi ha treballs en els que es defensa que l'apoptosi no és el mecanisme de mort cel·lular de les fibres musculars a diverses malalties neuromusculars pediàtriques com l'AME (Olivé M *et al.*, 1997; de Torres C *et al.*, 2000). És important ressaltar però, que tots aquests estudis es van realitzar en mostres postnals i generalment post mortem, és a dir, quan la malaltia ja ha fet el seu procés. En canvi, els nostres resultats s'han observat durant el desenvolupament de la malaltia. En els models animals també es pot fer un estudi durant el procés patològic. De fet, en el model de mutant muscular d'AME tampoc van trobar cèl·lules apoptòtiques, però sí van detectar necrosi, miòcits regenerants i una certa distròfia muscular. No observaren, però, denervació ni canvis morfològics de les neurones motores. En aquest model, les anomalies musculars es deuen a la mutació de *Smn* específicament en aquest teixit, però no comportaran una degeneració neuronal (Cifuentes-Díaz C *et al.*, 2002).

Pel que fa a l'expressió de Bcl-2, Bcl-X i Bax al múscul, no vàrem trobar diferències aparents en cap de les tres proteïnes. Aquest resultat, juntament amb la manca d'un increment de cèl·lules apoptòtiques al múscul esquelètic de les extremitats fetals, ens suggereix que els fetus amb AME no deuen presentar una activació del mecanisme de mort per aquesta via. Malgrat tot, els resultats obtinguts en biòpsies de pacients amb AME tipus I, en les que hi havia una baixa expressió de Bcl-2 deguda a l'escassa maduració de les fibres musculars, ens indicarà que no intervindrà de manera important en la supervivència d'aquestes cèl·lules en l'AME. Aquestes fibres no serien capaces de produir nivells suficients de Bcl-2 degut a la seva escassa maduració (Tews DS i Goebel HH, 1996). L'expressió de Bcl-X és més irregular, i això possiblement denota que ha començat en aquesta etapa del desenvolupament. Existeix poca informació sobre l'expressió d'aquesta proteïna a múscul esquelètic. Es va realitzar un treball però, en el que s'analitzava l'expressió de diversos membres de la família Bcl-2 en cultiu primari i una línia de cèl·lules musculars. Van trobar que Bcl-X s'expressava a mioblasts, miotubs i cèl·lules mare musculars, tant d'embrions com

de fetus i nounats (Dominov JA, *et al.*, 2001). Nosaltres també vam poder observar aquesta expressió als fetus control així com als AME, essent el patró similar. Malgrat aquesta manca de diferències a les tres proteïnes estudiades al múscul fetal, Tews DS i Goebel HH van detectar una expressió constant de Bax a les fibres musculars de biòpsies musculars de pacients amb AME tipus I. Aquesta expressió es correlaciona amb defectes en la innervació de les fibres musculars (Tews DS i Goebel HH, 1997).

A partir d'aquests resultats podem hipotetitzar que, el múscul esquelètic té un cert paper com a causant primari de la patologia, en la que intervindrà conjuntament el teixit neuronal. La mort de les neurones motores i la conseqüent manca d'innervació, juntament amb la manca de factors tròfics i maduresa del teixit muscular, afavoriran una alteració en el desenvolupament normal de les fibres musculars. De fet, en un treball realitzat amb cocultius de cèl·lules nervioses i musculars tant de controls com de pacients amb AME, van observar que en els cultius de cèl·lules de pacients, les fibres musculars AME no eren capaces d'impedir la mort de les neurones motores. En canvi, en els cultius control hi havia un retard d'aquesta mort. Els autors suggereixen que l'AME es deu a un defecte en la funció neurotròfica de les cèl·lules musculars (Guettier-Sigrist S *et al.*, 2002). Així doncs, es pot dir que la interacció dinàmica d'ambdós teixits estaria alterada en l'AME.

Expressió de SMN2

Per tal de completar el nostre estudi de l'AME, centrat principalment en el període fetal, vam realitzar l'anàlisi del patró d'expressió dels transcrits *SMN*, en col·laboració amb la Ivón Cuscó, doctoranda del grup AME. A més a més, també es va estudiar l'expressió de la proteïna SMN en els mateixos fetus. Vàrem analitzar la medul·la espinal i el múscul esquelètic, els dos teixits principalment afectats en la malaltia, així com d'altres en els que no s'observa cap patologia.

En analitzar l'expressió dels transcrits *SMN* a un fetus control de 15 setmanes, vam observar diferències entre els resultats obtinguts a la medul·la espinal i la resta de teixits. Mentre que a la medul·la espinal els transcrits *full-length* de SMN (*FL SMN*) depenen gairebé exclusivament del gen *SMN1*, a múscul i un altre teixit no afectat per la malaltia com és el ronyó, sembla que l'expressió de *SMN2* contribueix més en la quantitat de transcrit *FL SMN*. Aquests resultats suggereixen que als fetus control, *SMN2* està menys expressat a la medul·la espinal que al múscul o al ronyó, probablement perquè l'expressió de *SMN1* està afavorida. Per altra banda, a la medul·la espinal del fetus amb AME, la quantitat de *SMN* amb deleció de l'exó 7 (*SMNΔ7*) és molt més gran del que ho és al control. Malgrat tot, hi ha una proporció significativa de *FL SMN*. El grup de Gavrilov DK *et al.*

van analitzar línies cel·lulars limfoblàstiques humanes de pacients amb els tres tipus d'AME, i van observar que les mostres d'individus control tenien aproximadament el doble de *FL SMN* que de *SMNΔ7*. En canvi, en analitzar els tres tipus d'AME no van trobar diferències significatives pel que fa a la quantitat de *FL SMN*, però els tipus I i II tenien una producció significativament major de *SMNΔ7* que els AME tipus III. Els autors proposaven que *SMN2* tenia una certa patogenicitat, ja que els transcrits *SMNΔ7* estaven generats sols per *SMN2*. Hipotetitzaven també que, el transcrit alternatiu o la proteïna truncada que se'n deriva devia interferir en la funció normal del transcrit *SMN* o la proteïna intactes. Argumentaven que aquesta hipòtesi estava recolzada per les investigacions de Lorson C *et al.*, en les que es mostrava que la proteïna SMN a la que li manca l'exó 7 té una capacitat reduïda d'associar-se amb ella mateixa (Gavrilov DK *et al.*, 1998; Lorson C *et al.*, 1998). Jong YJ *et al.* van mostrar resultats similars. Aquests investigadors van analitzar limfoblasts d'individus control, portadors i pacients amb AME, així com diversos teixits fetals afectats per la malaltia, i van trobar una major quantitat de transcrits *FL SMN* a les mostres fetals que a limfoblasts de pacients amb la mateixa malaltia. Proposaven que aquest fet podria explicar perquè els símptomes es desenvolupen després del naixement. No observaren però, diferències en les quantitats de *SMNΔ7* en els tres tipus d'AME (Jong YJ *et al.*, 2000). En el nostre estudi vam trobar una proporció similar d'ambdós transcrits a la medul·la espinal, múscul i ronyó en els fetus amb AME. Si ho comparem amb els fetus control, veiem que *SMN2* deu estar possiblement sobreexpressat als fetus afectes, a fi i efecte de compensar la manca de *SMN1*. D'aquesta manera s'incrementa el nombre de transcrits *SMNΔ7* a la medul·la espinal, a on normalment predominen les formes *FL SMN* i les *SMNΔ7* es detecten escassament. A partir d'aquests resultats podem hipotetitzar que deu existir un factor específic de teixit que serà determinant de la malaltia, fent que la medul·la espinal sigui més sensible a la reducció de *FL SMN* i a l'augment substancial de *SMNΔ7*. Això ens suggereix que ambdós estan involucrats en el mecanisme de la malaltia. Aquesta hipòtesi es veu recolzada per un estudi realitzat per Kerr DA *et al.*, en el que van mostrar que *FL SMN* inhibia l'apoptosi neuronal induïda pel SV (*Sindbis virus*). En canvi, amb diferents mutacions de *SMN* (*SMNΔ7* o *Y272C*) hi havia una acceleració de la mort neuronal (Kerr DA *et al.*, 2000).

Per tal d'analitzar l'expressió de la proteïna SMN, vam utilitzar l'immunoblot i la immunohistoquímica, i amb aquestes dues tècniques vàrem detectar una disminució en l'expressió de la proteïna SMN a la medul·la espinal, múscul, ronyó i fibroblasts de fetus amb AME en comparació amb els control. La reducció fou de l'ordre d'un 25% a la medul·la espinal, mentre que a múscul va ser d'un 8% i a ronyó un 18%. En canvi, als fibroblasts en cultiu es va trobar una reducció molt més marcada, essent del 93%. Aquesta notable diferència es pot atribuir al fet que les condicions del cultiu *in vitro* no duen reflectir el que està passant exactament *in vivo*. Això dona suport al fet que *in vivo* hi hauria

una sobreexpressió de SMN2 que fa que la reducció de SMN no sigui tan important com *in vitro*. Això concordaria amb estudis anteriors realitzats en línies cel·lulars limfoblàstiques i en fibroblasts de pacients amb AME, en els que es mostra una reducció significativa de la quantitat de proteïna en comparació amb els control utilitzant la tècnica d'immunoblot (Coover D *et al.*, 1997; Lefebvre S *et al.*, 1997). Això també ha estat reportat en teixits fetals com el múscul (Burlet P *et al.*, 1998). Encara que en els nostres experiments no detectem aquesta diferència tan gran en teixit. Degut a que SMN2 transcriu principalment per la proteïna SMN Δ 7, hauria de donar una proteïna truncada amb un extrem C-terminal diferent. Tot i així, diferents experiments d'immunoblot han fracassat en la detecció d'aquesta proteïna més petita (Lorson CL i Androphy EJ, 2000; Dodds E *et al.*, 2001). És per això que la isoforma SMN Δ 7 es dedueix principalment dels estudis de mRNA. S'ha suggerit que els transcrits als que els manca l'exó 7 deuen seguir una via diferent de metabolisme de RNA, o deuen existir en un estat inestable, que portarà a uns nivells mínims o nuls de SMN (Jong YJ *et al.*, 2000).

Per altra banda, vam investigar la distribució de la proteïna SMN a teixits de fetus amb AME i controls a les 12 i 15 setmanes. En primer lloc, a la medul·la espinal vam observar una disminució en l'expressió de la proteïna SMN a les mostres AME. Tot i així, la seva distribució era molt similar tant a control com a fetus AME a les dues edats gestacionals analitzades, de manera que es pot dir que SMN2 té la mateixa expressió que SMN1 però en un menor grau. Tal com s'ha observat en estudis anteriors d'hibridació *in situ* (Novelli G *et al.*, 1997; Tizzano EF *et al.*, 1998) i d'expressió de proteïna (Battaglia G *et al.*, 1997; Lefebvre S *et al.*, 1997; Williams BY *et al.*, 1999; Francis JW *et al.*, 1998), l'expressió de SMN és predominant al citoplasma de les neurones motores de medul·la espinal fetal. Pel que fa als resultats obtinguts al múscul esquelètic fetal control, vam detectar la presència de la proteïna SMN tant al nucli com al citoplasma dels miofibres. En canvi, en les mostres AME, els nivells eren inferiors i la majoria dels nuclis presentaven una manca d'expressió amb una relativa conservació del senyal al citoplasma. En un estudi anterior realitzat en fibres esquelètiques de ratolins adults, es va reportar que hi havia una important expressió de la proteïna als nuclis d'aquestes cèl·lules (Williams BY *et al.* 1999). Burlet P *et al.* van detectar una elevada immunoreacció de SMN a citoplasma de múscul esquelètic fetal control, concentrant-se principalment a unes estructures citoplasmàtiques molt similars a les gems. Això no ho vam detectar al teixit afecte. Aquests autors tampoc van detectar senyals de la proteïna SMN a teixits com ronyó, timus, pulmó i cervell d'un fetus AME tipus I (Burlet P *et al.*, 1998). La única explicació que li trobem a aquesta discrepància amb els nostres resultats és el fet que aquests autors varen utilitzar mètodes d'immunofluorescència amb la intenció de detectar les gems, mentre que el nostre treball estava enfocat a definir la distribució i localització de les cèl·lules SMN positives.

L'anàlisi d'altres teixits no afectats per la malaltia com són cor, intestins, ronyó, pulmó i retina d'individus control, van mostrar uns nivells importants d'expressió de la proteïna SMN. Sorprenentment, la quantitat i distribució d'aquesta proteïna als teixits dels fetus AME va ser similar. Com en el cas de la medul·la espinal i el múscul, la distribució de la proteïna SMN no va ser generalitzada però sí localitzada a alguns tipus cel·lulars. Per exemple, vam trobar un alt nivell d'expressió a l'epiteli dels túbuls contornejats proximals i distals del ronyó i a les cèl·lules de la glàndula adrenal, essent igualment elevat als fetus AME. Vam trobar resultats similars a l'epiteli primordial del pulmó en desenvolupament, fibres miocardiàques, criptes intestinals i a les capes de les cèl·lules ganglionars de la retina. A la llengua, que acostuma a presentar fasciculacions als pacients AME, els nivells d'expressió van ser similars entre controls i afectes. Tots aquests resultats d'immunohistoquímica no ens permetien detectar canvis en l'extrem carboxi de la proteïna, donat que no es disposava d'un anticòs que reconegués la regió codificada per l'exó 7 de *SMN*, i és per això que érem incapaços de determinar si la proteïna detectada era FL o una proteïna amb un C-terminal diferent. L'anticòs que es va utilitzar reconeix l'extrem amino, per tant podíem assumir que es poden detectar, en teoria, les dues isoformes, la FL i la $\Delta 7$, tot i que al Western blot tan sols es detecta la forma FL. Així, l'expressió de SMN als teixits AME vindrà donada per SMN2, de manera que com a principal conclusió podem dir que SMN2 deu compensar la manca de SMN1 aportant als teixits no involucrats en la malaltia uns nivells de la proteïna similars al control. En canvi, la medul·la espinal i múscul esquelètic tindran una expressió tant quantitativament com qualitativament diferents, de manera que augmentaran les seves probabilitats d'estar afectats en l'AME.

Finalment, el possible paper de SMN2 com a compensador de la manca de SMN1, recolzaria les teràpies en les que intenten sobreexpressar la forma *full-length* de SMN2.

Conclusió general

Per concloure, es fa una reflexió de l'aportació de la feina realitzada durant aquests anys. Una de les coses que es poden destacar és la possibilitat d'estudiar la malaltia de l'AME en les primeres etapes del seu desenvolupament. Això ens ha permès detectar tota una sèrie d'alteracions que s'inicien abans del naixement en els afectes. Està clar que molts dels casos d'AME tipus I comencen en la vida intrauterina, essent aquest fet observat per les mares que notaven una disminució dels moviments fetals (MacLeod MJ, *et al.*, 1999). Malgrat tot, mai s'havia estudiat o demostrat una alteració específica durant aquest període. El treball d'aquesta tesi indica que, el primer signe d'afectació a l'AME durant el desenvolupament fetal és l'augment de la mort cel·lular programada. Cal destacar, que

aquest fet ha estat corroborat posteriorment per altres autors. Les neurones motores en aquesta etapa del desenvolupament no presenten alteracions morfològiques significatives, i proporcionalment mantenen la funció colinèrgica. Tot i això, existiria una desregulació de proteïnes antiapoptòtiques que augmentarien o contribuirien a la major sensibilitat de les neurones motores a aquesta mort cel·lular aberrant. A més a més, el múscul esquelètic, òrgan diana de les neurones motores, presenta signes d'immaduresa, que el deuen fer més vulnerable a la disminució del nombre de neurones. Una altra troballa fonamental és el què els passa a les neurones motores que no moren. Sembla que són funcionals, i és al període perinatal o postnatal a on apareixen els signes de degeneració. S'ha observat que una important proporció dels pacients amb la forma tipus I tenen un període prodròmic de dies o mesos fins que apareixen les primeres manifestacions de la malaltia. L'arreflèxia és un signe més precoç que la debilitat muscular, no obstant, deu haver una contribució del múscul en l'afectació, podent-se establir així una implicació dels dos teixits en el desencadenament de la malaltia. És evident que existeix un procés d'inici intrauterí, en el que es deu crear una susceptibilitat, i que alguna injúria o fins i tot l'absència d'un factor protector, probablement maternal o placentari, desencadenaria el florit quadre clínic de la malaltia, que coincideix amb les troballes anatomopatològiques d'autopsies. Podria ser la sobreexpressió del gen *SMN2* durant el període fetal el que compensaria fins a cert punt l'evolució? El conjunt d'aquests resultats ens poden ajudar a entendre tot el procés de la malaltia i els mecanismes que hi intervenen, per tal d'arribar a assolir una possible teràpia eficaç fins ara inexistent.

Conclusions

Mort neuronal

- La mort neuronal a la banya anterior de la medul·la espinal als individus amb AME tipus I s'inicia durant el desenvolupament fetal.
- L'augment de la vulnerabilitat del DNA en el procés de mort neuronal, ens suggereix que hi intervé un mecanisme apoptòtic que incrementa la mort cel·lular programada normal, que es dona durant la formació i desenvolupament dels teixits.
- La manca de neurones motores apoptòtiques i la presència de canvis patològics després del naixement, ens indiquen que podria existir un altre mecanisme fins ara desconegut que afectaria a les neurones motores en aquest període.
- La degeneració i mort de les neurones motores a l'AME tipus I deu venir determinada per una resposta que serà diferent segons l'estat de desenvolupament de l'individu. Sembla ser que en un principi hi ha una pèrdua progressiva de neurones motores que es dona durant el desenvolupament, i després, en el període perinatal, les neurones que resten comencen a ser disfuncionals, el que portaria a una denervació muscular.
- Els canvis en el patró d'expressió de Bcl-2 i Bcl-X observats a la medul·la espinal dels fetus amb AME podrien jugar un paper en la patogènesi i el mecanisme de la malaltia, de manera que les neurones motores quedarien desprotegides durant aquest període.
- No va ésser possible trobar diferències entres l'expressió de Bax a fetus control i AME, suggerint que aquesta proteïna no interviendria directament en el mecanisme de mort neuronal fetal de l'AME.

Funció colinèrgica

- Els fetus amb AME expressen una menor quantitat de ChAT possiblement perquè presenten un menor nombre de neurones motores. Tot i que la proporció de cèl·lules ChAT positives/negatives és similar a la dels control. Això ens suggereix que la quantitat de ChAT i per tant, la funció colinèrgica a les neurones motores que sobreviuen, deu ser normal als fetus AME durant aquest període.
- Als fetus amb AME, les neurones motores que no expressen ChAT, no presenten evidències d'una morfologia alterada.
- Als nounats amb AME, les neurones motores amb importants canvis degeneratius no presenten expressió de ChAT.
- La disfunció de la ChAT podria ser la conseqüència, i no un factor primari, de la degeneració de les neurones motores a l'AME.

Desenvolupament muscular

- Al múscul esquelètic dels fetus AME, ja s'observen anomalies morfològiques, suggerint una afectació del seu desenvolupament.
- No es va observar un augment de la mort cel·lular al múscul esquelètic dels fetus AME respecte els control, implicant que aquest mecanisme no és important inicialment en la patogènesi de l'AME al múscul.
- Les proteïnes de mort cel·lular Bcl-2, Bcl-X i Bax no semblen patir una desregulació durant el desenvolupament muscular dels fetus control i AME.

Expressió de SMN2

- A la medul·la espinal dels fetus amb AME, a més a més de la reducció de FL SMN, l'augment de SMN Δ 7, possiblement com a resultat de la sobreexpressió de SMN2, podria estar involucrat en el mecanisme de la malaltia.
- Als teixits no afectats per la malaltia com intestí, pulmó, glàndula adrenal, ronyó i ulls, l'expressió de SMN és similar tant als controls com als AME. En aquests teixits, SMN2 deu compensar l'absència de SMN1, mentre que a la medul·la espinal hi hauria una regulació més específica de SMN2 que comportaria l'aparició de la malaltia.

Bibliografia

A

Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science*. 1998; 28;281(5381):1322-6.

Andreassi C, Jarecki J, Zhou J, Coover DD, Monani UR, Chen X, Whitney M, Pollok B, Zhang M, Androphy E, Burghes AHM. Aclarubicin treatment restores SMN levels to cells derived from type I spinal muscular atrophy patients. *Hum Mol Genet*. 2001; 10:2841-49.

Andreassi C, Patrizi AL, Monani UR, Burghes AH, Brahe C, Eboli ML. Expression of the survival of motor neuron (SMN) gene in primary neurons and increase in SMN levels by activation of the N-methyl-D-aspartate glutamate receptor. *Neurogenetics*. 2002; 4(1):29-36.

Akli S, Caillaud C, Vigne E, Stratford PL, Poenaru L, Perricaudet M, Kahn A, Peschanski MR. Transfer of a foreign gene into the brain using adenovirus vectors. *Natl Genet*. 1993; 3:224-8.

Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC, Zurn AD, Aebischer P, Bueler H. Increased motoneuron survival and improved neuromuscular function in transgenic ALS mice after intraspinal injection of an adeno-associated virus encoding Bcl-2. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:803-11.

B

Baccon J, Pellizzoni L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. Identification and characterization of Gemin7, a novel component of the survival of motor neuron complex. *J Biol Chem*. 2002; 30;277(35):31957-62.

Bachand F, Boisvert FM, Cote J, Richard S, Autexier C. The product of the survival of motor neuron (SMN) gene is a human telomerase-associated protein. *Mol Biol Cell*. 2002; 13(9):3192-202.

Baron-Delage S, Abadie A, Echaniz-Laguna A, Melki J, Beretta L. Interferon and IRF-1 induce expression of the survival motor neuron (SMN) genes. *Mol Med*. 2000; 6:957-68.

Barth S, Liss M, Voss MD, Dobner T, Fischer U, Meister G, Grasser FA. Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 binds via its methylated arginine-glycine repeat to the survival motor neuron protein. *J Virol*. 2003; 77(8):5008-13.

Battaglia G, Princivalle A, Forti F, Lisier C, Zeviani M. Expression of the SMN gene, the spinal muscular atrophy determining gene, in the mammalian central nervous system. *Hum Mol Genet*. 1997; 6:1961-71.

Biagioni S, Tata AM, De Jaco A, Augusti-Tocco G. Acetylcholine synthesis and neuron differentiation. *Int J Dev Biol*. 2000; 44(6 Spec No):689-97.

Bledsoe AW, Jackson CA, McPherson S, Morrow CD. Cytokine production in motor neurons by poliovirus replicon vector gene delivery. *Natl Biotechnol*. 2000; 18:964-9.

Blot S, Poirer C, Dreyfus PA. The mouse mutation muscle deficient (mdf) is characterized by a progressive motor neuron disease. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1995; 54:812-25.

- Brown R. The bcl-2 family of proteins. *Br Med Bull.* 1997; 53(3):466-77.
- Bruce G, Wainer BH, Hersh LB. Immunoaffinity purification of human choline acetyltransferase: comparison of the brain and placenta enzymes. *J Neurochem.* 1985; 45:611-20.
- 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.* 1990; 344:540-1.
- Bühler D, Raker V, Lührmann R, Fischer U. Essential role for the tudor domain of SMN in spliceosomal U snRNP assembly: implications for spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1999; 8:2351-7.
- Burghes AH. When is a deletion not a deletion? When it is converted. *Am J Hum Genet.* 1997; 61(1):9-15.
- Bürglen L, Lefebvre S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Cruaud C, Munnich A, Melki J. Structure and organization of the human survival motor neuron gene. *Genomics.* 1996; 32:479-82.
- Bürglen L, Seroz T, Miniou P, Lefebvre S, Burlet P, Munnich A, Viegas-Pequignot E, Egly JM, Melki J. The gene encoding p44, a subunit of the transcription factor TFIIH, is involved in large-scales deletions associated with Werdnig-Hoffmann disease. *Am J Hum Genet.* 1997; 60:72-9.
- Burlet P, Bürglen L, Clermont O, Lefebvre S, Viollet L, Munnich A, Melki J. Large-scale deletions of the 5q13 region are specific to Werdnig-Hoffmann disease. *J Med Genet* 1996; 33:281.
- Burlet P, Huber C, Bertrand S, Ludosky MA, Zwaenepoel I, Clermont O, Roume J, Delezoide AL, Cartaud J, Munnich A, Lefebvre S. The distribution of SMN protein complex in human fetal tissues and its alteration in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 1998; 7:1927-33.
- Bussaglia E, Clermont O, Tizzano E, Lefebvre S, Bürglen L, Cruaud C, Urtizberea JA, Colomer J, Munnich A, Baiget M, Melki J. A frameshift deletion in the survival motor neuron gene in Spanish spinal muscular atrophy patients. *Nature Genetics.* 1995; 11:335-7.
- Bussaglia E, Tizzano EF, Illa I, Cervera C, Baiget M. Cramps and minimal EMG abnormalities as preclinical manifestations of spinal muscular atrophy patients with homozygous deletions of the SMN gene. *Neurology.* 1997; 48(5):1443-5.
- ## C
- Campbell L, Potter A, Ignatius J, Dubowitz V, Davis K. Genomic variation and gene conversion in spinal muscular atrophy: implications for disease process and clinical phenotype. *Am J Hum Genet.* 1997; 61:40-50.
- Campbell L, Hunter KM, Mohaghegh P, Tinsley JM, Brasch MA, Davies KE. Direct interaction of Smn with dp 103, a putative RNA helicase: a role for Smn in transcription regulation? *Hum Mol Genet.* 2000; 9:1093-100.
- Capon F, Lo Cicero S, Levato C, Novelli G, Dallapiccola B. De novo deletions of the 5q13 region and prenatal diagnosis of

spinal muscular atrophy. *Prenat Diagn.* 1995; 15:93-4.

Carlson BM. Embriología humana y biología del desarrollo. Harcourt-Mosby. 2ª edición. 2000.

Carnegie GK, Sleeman JE, Morrice N, Hastie CJ, Pegg MW, Philp A, Lamond AI, Cohen PT. Protein phosphatase 4 interacts with the Survival of Motor Neurons complex and enhances the temporal localisation of snRNPs. *J Cell Sci.* 2003; 15;116(Pt 10):1905-13.

Carter TA, Bönnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, de Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC. A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions. *Hum Mol Genet.* 1997; 6:229-36.

Chang BS, Minn AJ, Muchmore SW, Fesik SW, Thompson CB. Identification of a novel regulatory domain in Bcl-X_L and Bcl-2. *EMBO J.* 1997; 16(5):968-77.

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.* 2001; 98:9808-13.

Charriaut-Marlangue C, Ben-Ari Y. A cautionary note on the use of the TUNEL stain to determine apoptosis. *Neuroreport.* 1995; 7:61-64.

Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G. Gemin3: a novel DEAD box protein that interacts with SMN, the spinal muscular

atrophy gene product, and is a component of gems. *J Cell Biol.* 1999; 147:1181-94.

Charroux B, Pellizzoni L, Perkinson RA, Yong J, Shevchenko A, Mann M, Dreyfuss G. Gemin4. A novel component of the SMN complex that is found in both gems and nucleoli. *J Cell Biol.* 2000; 148:1177-86.

Cifuentes-Diaz C, Frugier T, Tiziano FD, Lacène E, Roblot N, Joshi V, Moreau MH, Melki J. Deletion of murine SMN exon 7 directed to skeletal muscle leads to severe muscular dystrophy. *J Cell Biol.* 2001; 152:1107-14.

Cifuentes-Diaz C, Nicole S, Velasco ME, Borra-Cebrian C, Panozzo C, Frugier T, Millet G, Roblot N, Joshi V, Melki J. Neurofilament accumulation at the motor endplate and lack of axonal sprouting in a spinal muscular atrophy mouse model. *Hum Mol Genet.* 2002; 1;11(12):1439-47.

Cisterni C, Kallenbach S, Jordier F, Bagnis C, Pettmann B. Death of motoneurons induced by trophic deprivation or by excitotoxicity is not prevented by overexpression of SMN. *Neurobiol Dis.* 2001; 8(2):240-51.

Claus P, Doring F, Gringel S, Muller-Ostermeyer F, Fuhrott J, Kraft T, Grothe C. Differential intranuclear localization of fibroblast growth factor-2 isoforms and specific interaction with the survival of motoneuron protein. *J Biol Chem.* 2003; 3;278(1):479-85.

Clarke PG. Developmental cell death: morphological diversity and multiple mechanisms. *Anat Embryol (Berl).* 1990; 181:195-213.

- Clowry GJ, Arnott GA, Clement-Jones M, Fallah Z, Gould S, Wright C. Changing pattern of expression of parvalbumin immunoreactivity during human fetal spinal cord development. *J Comp Neurol*. 2000; 7;423(4):727-35.
- Cobben JM, van der Steege G, Grootsholten P, de Visser M, Scheffer H, Buys CH. Deletions of the survival motor neuron gene in unaffected siblings of patients with spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet*. 1995; 57(4):805-8.
- Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today*. 1993; 14:126-30.
- Coovert D, Le TT, McAndrew, Strasswimmer J, Crawford TO, Mendell JR, Coulson S, Androphy EJ, Prior TW, Burghes AHM. The survival motor neuron protein in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet*. 1997; 6:1205-14.
- Coovert D, Le TT, Morris GE, Man NT, Kralewski M, Sendtner M, Burghes AH. Does the survival motor neuron protein (SMN) interact with Bcl-2? *J Med Genet*. 2000; 37(7):536-9.
- Cork LC, Griffin JW, Munnell JF, Lorenz MD, Adams RJ. Hereditary canine spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1979; 38(3):209-21.
- Crawford TO, Pardo CA. The neurobiology of childhood spinal muscular atrophy. *Neurobiol Dis*. 1996; 3(2):97-110.
- Cuscó I, Barceló MJ, del Río E, Martín Y, Hernández-Chico C, Bussaglia E, Baiget M, Tizzano EF. Characterisation of SMN hybrid genes in Spanish SMA patients: de novo, homozygous and compound heterozygous cases. *Hum Genet*. 2001; 108(3):222-9.
- Cuscó I, Barceló MJ, Baiget M, Tizzano EF. Implementation of SMA carrier testing in genetic laboratories: comparison of two methods for quantifying the SMN1 gene. *Hum Mutat*. 2002; 20(6):452-9.
- D**
- Daniel PT. Dissecting the pathways to death. *Leukemia*. 2000; 14(12):2035-44.
- de Torres C, Munell F, Roig M, Macaya A. Análisis del patrón de fragmentación del ADN en enfermedades neuronusculares pediátricas. *Rev Neurol*. 2000; 16-31;30(10):901-6.
- de Torres C, Munell F, Roig M, Reventos J, Macaya A. Naturally occurring cell death during postnatal development of rat skeletal muscle. *Muscle Nerve*. 2002; 26(6):777-83.
- Deckwerth TL, Elliott JL, Knudson CM, Johnson Jr EM, Snider WD, Korsmeyer SJ. Bax is required for neuronal death after trophic factor deprivation and during development. *Neuron*. 1996; 17:401-411.
- Delmas J, Delmas A. Vías y centros nerviosos. Introducción a la neurología. Traducido por Gómez L. 2ª edición. Toray-Masson SA. Barcelona. 1965; p21-52.
- a)DiDonato CJ, Ingraham SE, Mendell JR, Prior TW, Lenard S, Moxley RT3rd, Florence J, Burghes AH. Deletion and conversion in spinal muscular atrophy patients: is there a relationship to severity? *Ann Neurol*. 1997; 41: 230-7.
- b)DiDonato CJ, Chen XN, Noya D, Korenberg JR, Nadeau JH Simard LR.

Cloning, characterization, and copy number of the murine survival motor neurone gene: homolog of the spinal muscular atrophy-determining gene. *Genome Res.* 1997; 7:339-52.

DiDonato CJ, Parks RJ, Kothary R. Development of a gene therapy strategy for the restoration of survival motor neuron protein expression: implications for spinal muscular atrophy therapy. *Hum Gene Ther.* 2003; 20;14(2):179-88.

Dobransky T, Davis WL, Xiao G-H, Rylett RJ. Expression, purification and characterization of recombinant human choline acetyltransferase: phosphorylation of the enzyme regulates catalytic activity. *Biochem J.* 2000; 349:141-51.

Dodds E, Dunckley MG, Roberts RG, Muntoni F, Shaw CE. Overexpressed human survival motor neurone isoforms, SMNDeltaexon7 and SMN+exon7, both form intranuclear gems but differ in cytoplasmic distribution. *FEBS Lett.* 2001; 20;495(1-2):31-8.

Dominov JA, Houlihan-Kawamoto CA, Swap CJ, Miller JB. Pro- and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family in skeletal muscle: a distinct role for Bcl-2 in later stages of myogenesis. *Dev Dyn.* 2001; 220(1):18-26.

Dupont E, Sansal I, Evrard C, Rouget P. Developmental pattern of expression of NPDC-1 and its interaction with E2F-1 suggest a role in the control of proliferation and differentiation of neural cells. *J Neurosc Res.* 1998; 51:257-67.

E

Echaniz-Laguna A, Miniou P, Bartholdi D, Melki J. The promoters of the survival

motor neuron gene (SMN) and its copy (SMN_C) share common regulatory elements. *Am J Hum Genet.* 1999; 64:1365-70.

Emery AE. The nosology of the spinal muscular atrophies. *J Med Genet.* 1971; 8(4):481-95.

Engel WK. Selective and nonselective susceptibility of muscle fiber types. A new approach to human neuromuscular diseases. *Arch Neurol.* 1970; 22(2):97-117.

Engel AG. The Neuromuscular Junction. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C editors. *Myology. Basic and Clinical.* McGraw-Hill, Inc, 1994; p261-96.

F

Fan L, Simard LR. Survival motor neuron (SMN) protein: role in neurite outgrowth and neuromuscular maturation during neuronal differentiation and development. *Hum Mol Genet.* 2002; 1;11(14):1605-14.

Fawcett DW. Tratado de Histología. Bloom-Fawcett. 11^a edición. Interamericana-McGraw-Hill, 1987.

Feldkötter 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.* 2002; 70(2):358-68.

Ferrer I, Serrano T, Rivera R, Olive M, Zujar MJ, Graus F. Radiosensitive populations and recovery in X-ray-induced apoptosis in the developing cerebellum. *Acta Neuropathol (Berl).* 1993; 86:491-500.

Ferrer I. Motor neuron diseases: A type of programmed cell death? *Neurologia*. 1996; 11(Suppl. 5):7-13.

Fidzianska-Dolot A, Hausmanowa-Petrusewicz I. Morphology of the lower motor neuron and muscle. In: Gamstorp I, Sarnat HB editors. *Progressive Spinal Muscular Atrophies*. Raven Press, New York. 1984; 55-89.

Fidzianska A, Goebel HH, Warlo I. Acute infantile spinal muscular atrophy. Muscle apoptosis as a proposed pathogenetic mechanism. *Brain*. 1990; 113(Pt 2):433-45.

Fidzianska A, Rafalowska J. Motoneuron death in normal and spinal muscular atrophy-affected human fetuses. *Acta Neuropathol (Berl)*. 2002; 104(4):363-8.

Fischer U, Liu Q, Dreyfuss G. The SMN-SIP-1 complex has an essential role in spliceosomal snRNP biogenesis. *Cell*. 1997; 90:1023-9.

Forger NG, Breedlove SM. Motoneuronal death during human foetal development. *J Comp Neurol*. 1987; 264:118-22.

Francis JW, Sandrock AW, Bhide PG, Vonsattel JP, Brown RH Jr. Heterogeneity of subcellular localization and electrophoretic mobility of survival motor neuron (SMN) protein in mammalian neural cells and tissues. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1998; 95:6492-7.

Frankowski H, Missotten M, Fernandez PA, Martinou I, Michel P, Sadoul R, Martinou JC. Function and expression of the Bcl-x gene in the developing and adult nervous system. *Neuroreport*. 1995; 2;6(14):1917-21.

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*. 2000; 9:849-58.

Fujii T, Tajima S, Yamada S, Watanabe Y, Sato KZ, Matsui M, Misawa H, Kasaha T, Kawashima K. Constitutive expression of mRNA for the same choline acetyltransferase as that in the nervous system, an acetylcholine-synthesizing enzyme, in human leukemic T-cell lines. *Neurosci Lett*. 1999; 259:71-4.

G

Gangwani L, Mikrut M, Theroux S, Sharma M, Davis RJ. Spinal muscular atrophy disrupts the interaction of ZPR1 with the SMN protein. *Nat Cell Biol*. 2001; 3:376-83.

Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labelling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Bio*. 1992; 119:493-501.

Gavrilov DK, Shi X, Das K, Gilliam TC, Wang CH. Differential SMN2 expression associated with SMA severity. *Nat Genet*. 1998; 20:230-1.

Gennarelli M, Lucarelli M, Capon F, Pizzuti A, Merlini L, Angelini C, Novelli G, Dallapiccola B. Survival motor neuron gene transcript analysis in muscles from spinal muscular atrophy patients. *Biochem Res Commun*. 1995; 213:342-8.

Giesemann T, Rathke-Hartlieb S, Rothkegel M, Bartsch JW, Buchmeier S, Jockusch BM, Jockusch H. A role for

polyproline motifs in the spinal muscular atrophy protein SMN. Profilins bind to and colocalize with smn in nuclear gems. *J Biol Chem.* 1999; 274:37908-14.

Giménez C, Satrústegui J, Aragón C. Neurobioquímica. En: Herrera E. Bioquímica. Biología Molecular y Bioquímica Fisiológica. 2ª edición. Vol. II. Interamericana-McGraw-Hill. 1991; p1421-53.

Graus F, Ferrer I. Analysis of neuronal antigen (Hu) expression in the developing rat brain detected by autoantibodies from patients with paraneoplastic encephalomyelitis. *Neurosci Lett.* 1990; 112:14-8.

Greenlund LJ, Korsmeyer SJ, Johnson Jr EM. Role of bcl-2 in the survival and function of developing and mature neurons. *Neuron.* 1995 ;15:639-641.

Grundhoff AT, Kremmer E, Tureci O, Glieden A, Gindorf C, Atz J, Mueller-Lantzsch N, Schubach WH, Grasser FA. Characterization of DP103, a novel DEAD box protein that binds to the Epstein-Barr virus nuclear proteins EBNA2 and EBNA3C. *J Biol Chem.* 1999; 274:19136-44.

Gubitz AK, Mourelatos Z, Abel L, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. Gemin5, a novel WD repeat protein component of the SMN complex that binds Sm proteins. *J Biol Chem.* 2002; 277(7):5631-6.

Guettier-Sigrist S, Hugel B, Coupin G, Freyssinet JM, Poindron P, Warter JM. Possible pathogenic role of muscle cell dysfunction in motor neuron death in

spinal muscular atrophy. *Muscle Nerve.* 2002; 25(5):700-8.

H

Hahnen E, Forkert R, Marke C, Rudnik-Schoneborn S, Schonling 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.* 1995; 4(10):1927-33.

Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A. Spinal muscular atrophy: Foetal-like histopathological pattern in Werdnig-Hoffmann disease. *Bull NY Acad Med.* 1974; 50(11):1157-72.

Hausmanowa-Petrusewicz I, Fidzianska A, Niebroj-Dobosz I, Strugalska MH. Is Kugelberg-Welander spinal muscular atrophy a fetal defect? *Muscle Nerve.* 1980; 3(5):389-402.

Hayashi M, Arai N, Murakami T, Yoshio M, Oda M, Matsuyama H. A study of cell death in Werdnig Hoffman disease brain. *Neurosci Lett.* 1998; 243:117-20.

Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B. Htra2- β 1 stimulates an exonic splicing enhancer and can restore full-length SMN expression to survival motor neuron 2 (SMN2). *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97:9618-23.

Hofmann Y, Wirth B. hnRNP-G promotes exon 7 inclusion of survival motor neuron (SMN) via direct interaction with Htra2-beta1. *Hum Mol Genet.* 2002; 15;11(17):2037-49.

Hottinger AF, Azzosuz M, Deglon N, Aebischer P, Surn AD. Complete and

long-term rescue of lesioned adult motoneurons by lentiviral-mediated expression of glial cell line-derived neurotrophic factor in the facial nucleus. *J Neurosci.* 2000; 20:5587-93.

Hsieh-Li HM, Chang J, Jong Y, Wu M, Wang NM, Tsai CH, Li H. A mouse model for spinal muscular atrophy. *Nat Genet.* 2000; 24:66-70.

Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Núñez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1998; 95:4386-91.

I

Ibáñez CF, Peltö-Huikko M, Söder O, Ritzén EM, Hersch LB, Hökfelt T, Persson H. Expression of choline acetyltransferase mRNA in spermatogenic cells results in an accumulation of the enzyme in the postacrosomal region of mature spermatozoa. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1991; 88:3676-80.

Iwahashi H, Eguchi Y, Yasuhara N, Hanafusa T, Matsuzawa Y, Tsujimoto Y. Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature.* 1997; 27;390(6658):413-7.

J

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* 2000; 9:341-46.

Jablonka S, Bandilla M, Wiese S, Buhler D, Wirth B, Sendtner M, Fischer U. Co-regulation of survival of motor neuron

(SMN) protein and its interactor SIP 1 during development and in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2001; 10:497- 505.

Jablonka S, Holtmann B, Meister G, Bandilla M, Rossoll W, Fischer U, Sendtner M. Gene targeting of Gemin2 in mice reveals a correlation between defects in the biogenesis of U snRNPs and motoneuron cell death. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2002; 23;99(15):10126-31.

Jacob A, Budhiraja S, Reichel RR. Differential induction of HNF-3 transcription factors during neuronal differentiation. *Exp Cell Res.* 1997; 234:277-84.

Jacobson MD, Weil M, Raff MC. Programmed cell death in animal development. *Cell.* 1997; 88:347-54.

Jong YJ, Chang JG, Lin SP, Yang TY, Wang JC, Chang CP, Lee CC, Li H, Hsieh-Li HM, Tsai CH. Analysis of the mRNA transcripts of the survival motor neuron (SMN) gene in the tissue of an SMA fetus and the peripheral blood mononuclear cells of normals, carriers and SMA patients. *J Neurol Sci.* 2000; 173:147-53.

K

Kato T, Murashima YL. Choline acetyltransferase activities in single motor neurons from vertebrate spinal cords. *J Neurochem.* 1985; 3:675-9

Kaupmann K, Simon-Chazottes D, Guenet J-L, Jockusch H. Wobbler, a mutation affecting motorneuron survival and gonadal function in the mouse, maps to chromosome 11. *Genomics.* 1992; 13:39-43.

Keir SD, Mitchell WJ, Feldman LT, Martin JR. Targeting and gene expression in spinal cord motor neurons following intramuscular inoculation of an HSV-1 vector. *J Neurovirol.* 1995; 1:259-67.

Kelly AM, Rubinstein NA. The Diversity of Muscle Fiber Types and Its Origin during Development. In: Engel AG, Franzini-Armstrong C editors. *Myology. Basic and Clinical.* McGraw-Hill, Inc, 1994; p119-33.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972; 26:239-57.

Kerr JF, Harmon BV. Definition and incidence of apoptosis: In: historical perspective. A: Tomei LD, Cope FO editors. *Apoptosis: The Molecular Basis of Cell Death.* Cold Spring Harbor, NY, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1991; p7.

Kerr DA, Nery JP, Traystman RJ, Chau BN, Hardwick JM. Survival motor neuron protein modulates neuron-specific apoptosis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 21;97(24):13312-7.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 1997; 3:614-20.

Kugelberg E, Welander L. Heredofamilial proximal spinal muscular atrophy simulating muscular dystrophy. *Arch Neurol Psychiatri (Chic).* 1956; 75:500-9.

L

La Bella V, Cisterni C, Salaun D, Pettmann B. Survival motor neuron

(SMN) protein in rat is expressed as different molecular forms and is developmentally regulated. *Eur J Neurosci.* 1998;10(9):2913-23.

La Bella V, Kallenbach S, Pettmann B. Expression and subcellular localization of two isoforms of the survival motor neuron protein in different cell types. *J Neurosci Res.* 2000; 62:346-56.

LeBrun DP, Warnke RA, Cleary ML. Expression of bcl-2 in fetal tissues suggests a role in morphogenesis. *Am J Pathol.* 1993; 142(3):743-53.

Lefebvre S, Bürglen L, Reboullet S, Clermont O, Bulret P, Viollet L Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, Le Paslier D, Frézai J, Cohen D, Weissenbach J, Munnich A, Melki J. Identification and characterization of spinal muscular atrophy determining gene. *Cell.* 1995; 80:155-65.

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. *Nature Genet.* 1997; 16:265-9.

Lefebvre S, Burlet P, Viollet L, Bertrand S, Huber C, Belser C, Munnich A. A novel association of the SMN protein with two major non-ribosomal nucleolar proteins and its implication in spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2002; 1;11(9):1017-27.

Lesbordes JC, Cifuentes-Diaz C, Miroglio A, Joshi V, Bordet T, Kahn A, Melki J. Therapeutic benefits of cardiotrophin-1 gene transfer in a mouse model of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2003; 1;12(11):1233-9.

Lindsay RM. Neuron saving schemes. *Nature*. 1995; 373:289-90.

Liston P, Roy N, Tamal K, Lefevre C, Baird S, Cherton-Horvat G, Farahani R, McLean M, Ikeda JE, MacKenzie A, Korneluk RG. Suppression of apoptosis in mammalian cells by NAIP and a related family of IAP genes. *Nature*. 1996; 379:349-53.

Liu Q, Dreyfuss G. A novel nuclear structure containing the survival of motor neurons protein. *EMBO J*. 1996; 15:3555-65.

Liu Q, Fischer U, Wang F, Dreyfuss G. The spinal muscular atrophy disease gene product, SMN, and its associated protein SIP1 are in a complex with spliceosomal snRNP proteins. *Cell*. 1997; 90:1013-21.

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*. 1998; 19:63-6.

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

Lorson CL, Androphy EJ. An exonic enhancer is required for inclusion of an essential exon in the SMA-determining gene SMN. *Hum Mol Genet*. 2000; 9:259-65.

M

MacKenzie AE, Gendron NH. Tudor reign. *Nat Struct Biol*. 2001; 8(1):13-5.

MacLeod MJ, Taylor JE, Lunt PW, Mathew CG, Robb SA. Prenatal onset spinal muscular atrophy. *Eur J Paediatr Neurol*. 1999; 3(2):65-72.

Mahoney K, Vogel WH, Salvenmoser F, Boehme DH. Activity of choline acetyltransferase in various human adult and fetal tissues. *J Neurochem*. 1971; 18:1357-1359.

Majno G, Joris I. Apoptosis, oncosis and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol*. 1995; 146:3-15.

Marusisch MF, Furneaux HM, Henion PD, Weston JA. Hu neuronal proteins are expressed in proliferating neurogenic cells. *J Neurobiol*. 1994; 25:143-55.

Mastaglia FL, Walton JN. An electron microscopic study of skeletal muscle from cases of the Kugelberg-Welander syndrome. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1971; 17(3):201-19.

Matera AG, Frey MR. Coiled bodies and gems: Janus o gemini? *Am J Hum Genet*. 1998; 63:317-321.

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*. 1997; 60:1411-22.

Meister G, Bühler D, Laggerbauer B, Zobawa M, Lottspeich, 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*

2000; 9:1977-86.

Meister G, Fischer U. Assisted RNP assembly: SMN and PRMT5 complexes cooperate in the formation of spliceosomal UsnRNPs. *EMBO J.* 2002; 1;21(21):5853-63.

a)Melki J, Sheth P, Abdelhak S, Burlet P, Bachelot MF, Lathrop MG, Frézal J, Munnich A i els investigadors de l'Atròfia Muscular Espinal Francesa. Mapping of acute (type I) spinal muscular atrophy to chromosome 5q12-q14. *Lancet.* 1990; 336:271-3.

b)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, Frézal A. Gene for chronic proximal spinal muscular atrophies maps to chromosome 5q. *Nature.* 1990; 344:767-8.

Melki J, Lefebvre S, Bürglen L, Burlet P, Clermont O, Millasseau P, Reboullet S, Benichou 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.* 1994; 264:1474-7.

Meng A, Tang H, Ong BA, Farrell MJ, Lin S. Promoter analysis in living zebrafish embryos identifies a cis-acting motif required for neuronal expression of GATA-2. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997; 94:6267-72.

Merry DE, Veis DJ, Hickey WF, Korsmeyer SJ. bcl-2 protein expression is widespread in the developing nervous

system and retained in the adult PNS. *Development.* 1994; 120(2):301-11.

Merry DE, Korsmeyer SJ. Bcl-2 gene family in the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1997; 20:245-67.

Milligan CE, Schwartz LM. Programmed cell death during animal development. *Br Med Bull.* 1997; 52:570-90.

Misawa H, Matsuura J, Oda Y, Takahashi R, Deguchi T. Human choline acetyltransferase mRNAs with different 5'-region produce a 69-kDa major translation product. *Brain Res Mol Brain Res.* 1997; 44(2):323-33.

Mitchell PJ, Timmons PM, Hebert JM, Rigby PW, Tjian R. Transcription factor AP-2 is expressed in neural crest cell lineages during mouse embryogenesis. *Genes Dev.* 1991; 5:105-19.

a)Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AHM, McPherson JD. A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* 1999; 8:1177-83.

b)Monani UR, McPherson JD, Burghes AH. Promoter analysis of the human centromeric and telomeric survival motor neuron genes (SMNC and SMNT). *Biochim Biophys Acta.* 1999; 1445:330-6.

a)Monani UR, Sendtner M, Covert DD, Parsons DW, Andreassi C, Le TT, Jablonka S, Schrank B, Rossol 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.* 2000; 9:333-9.

b) Monani UR, Coovert DD, Burghes AHM. Animal models of spinal muscular atrophy. *Hum Mol Genet.* 2000; 9:2451-7.

Motoyama N, Wang F, Roth KA, Sawa H, Nakayama K, Nakayama K, Negishi I, Senju S, Zhang Q, Fujii S, Loh DY. Massive cell death of immature hematopoietic cells and neurons in Bcl-X-deficient mice. *Science.* 1995; 267:1506-10.

Munsat TL. Workshop report: International SMA collaboration. *Neuromusc Disord.* 1991; 1:81.

Muroishi Y, Kasashima I, Oda Y. Immunohistochemical and in situ hybridization studies of choline acetyltransferase in large motor neurons of the human spinal cord. *Histol Histopathol.* 2000; 15:689-96

N

Nicholson LVB, Davison K, Falkous G, Harwood C, O'Donnell E, Slater CR, Harris JB. Dystrophin in skeletal muscle. Western blot analysis using a monoclonal antibody. *J Neurol Sci.* 1989; 94:125-36.

Novelli G, Calzà L, Amicucci P, Giardino L, Pozza M, Silani V, Pizzuti A, Gennarelli M, Piombo G, Capon F, Dallapiccola B. Expression study of survival motor neuron gene in human fetal tissues. *Biochem Mol Med.* 1997; 61:102.

O

Oda Y, Nakanishi I, Deguchi T. A complementary DNA for human choline acetyltransferase induces two forms of

enzyme with different molecular weights in cultured cells. *Mol Brain Res* 1992; 16: 287-94.

Oda Y, Imai S, Nakanishi I, Ichikawa T, Deguchi T. Immunohistochemical study on choline acetyltransferase in the spinal cord of patients with amyotrophic lateral sclerosis. *Pathol Int.* 1995; 45:933-9.

Oda Y, Nakanishi I. The distribution of cholinergic neurons in the human central nervous system. *Histol Histopathol.* 2000; 15(3):825-34.

Olivé M, Martinez-Matos JA, Montero J, Ferrer I. Apoptosis is not the mechanism of cell death of muscle fibers in human muscular dystrophies and inflammatory myopathies. *Muscle Nerve.* 1997; 20(10):1328-30.

Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell.* 1993; 27;74(4):609-19.

Oppenheim RW. Cell death during development of the nervous system. *Annu Rev Neurosci.* 1991; 14:453-501.

P

Pagliardini S, Giavazzi A, Setola V, Lizier C, Di Luca M, DeBiasi S, Battaglia G. Subcellular localization and axonal transport of the survival motor neuron (SMN) protein in the developing rat spinal cord. *Hum Mol Genet.* 2000; 9:47-56.

Pan G, O'Rourke K, Dixit VM. Caspase-9, Bcl-X_L, and Apaf-1 form a ternary complex. *J Biol Chem.* 1998; 273(10):5841-5.

- Paushkin S, Gubitza AK, Massenet S, Dreyfuss G. The SMN complex, an assemblyosome of ribonucleoproteins. *Curr Opin Cell Biol.* 2002; 14(3):305-12.
- Pearn J. Incidence, prevalence, and gene frequency studies of chronic childhood spinal muscular atrophy. *J Med Genet.* 1978; 15(6):409-13.
- Pearn J. Spinal muscular atrophies. In: Emery AEH, Rimoin DL editors. Principles and practice of medical genetics. 1990; p565-78.
- Pellizzoni L, Kataoka N, Charroux B, Dreyfuss G. A novel function for SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product, in pre-mRNA splicing. *Cell.* 1998; 95:615-24.
- Pellizzoni L, Charroux B, Dreyfuss G. SMN mutants of spinal muscular atrophy patients are defective in binding of snRNP protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999; 96:11167-72.
- 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.* 2001; 152:75-85.
- a) Pellizzoni L, Baccon J, Rappsilber J, Mann M, Dreyfuss G. Purification of native survival of motor neurons complexes and identification of Gemin6 as a novel component. *J Biol Chem.* 2002; 1;277(9):7540-5.
- b) Pellizzoni L, Yong J, Dreyfuss G. Essential role for the SMN complex in the specificity of snRNP assembly. *Science.* 2002; 29;298(5599):1775-9.
- Perry EK, Smith CJ, Atack JR, Candy JM, Johnson M, Robert HP. Neocortical cholinergic enzyme and receptor activities in the human fetal brain. *J Neurochem.* 1986; 4: 1262-9.
- Phelps PE, Brennan LA, Vaughn JE. Generation pattern of immunocytochemically identified cholinergic neurons in rat brainstem. *Brain Res Dev Brain Res.* 1990; 1:63-74.
- Pumarola M, Añor S, Majó N, Borrás D, Ferrer I. Spinal muscular atrophy in Holstein-Friesian calves. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997; 93:178-83.
- R**
- Raclin V, Saugier-Verber P, Bürglen L, Munnich A, Melki J. De novo deletions in spinal muscular atrophy: Implications for genetic counselling. *J Med Genet.* 1997; 34:86-7.
- Raff MC, Barres BA, Burne JF, Coles HS, Ishizaki Y, Jacobson MD. Programmed cell death and the control of cell survival: Lessons from the nervous system. *Science.* 1993; 262:695-700.
- Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death. *J Cell Biol.* 1994; 124:4-6.
- Resendes MC, Dobransky T, Ferguson SS, Rylett RJ. Nuclear localization of the 82-kDa form of human choline acetyltransferase. *J Biol Chem.* 1999; 2;274(27):19417-21.
- Robert I, Quirin-Stricker C. A novel untranslated 'exon H' of the human choline acetyltransferase gene in placenta. *J Neurochem.* 2001; 79(1):9-16.

Rodrigues NR, Owen N, Talbot K, Patel S, Muntoni F, Ignatius J, Dubowitz V, Davies KE. Gene deletion in spinal muscular atrophy. *J Med Genet.* 1996; 33:93-6.

Rojas-García R, Tizzano E, Cuscó I, Gallardo E, Barceló MJ, de Andrés I, Larrode P, Marti-Massó JF, Martínez-Matos JA, Povedano M, Rallo B, Serrano S, Baiget M, Illa I. The absence of survival motor neuron 2 gene may play a role in multifocal motor neuropathy. *Neurology.* 2002; 8;59(7):1112-3.

Rossoll W, Kroning 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.* 2002; 1;11(1):93-105.

Roy N, Mahadevan MS, Mclean M, Shutler G, Yaraghi Z, Farahani R, Baird S, Besner Johnston A, Lefebvre C, Kang X, Salih M, Aubry H, Tamai K, Guan X, Ioannou P, Crawford TO, de Jong PJ, Surh L, Ikeda JE, Korneluk RG, MacKenzie. The gene for neural apoptosis inhibitory protein is partially deleted in individuals with spinal muscular atrophy. *Cell.* 1995; 80:167-78.

Rubin LL. Neuronal cell death: when, why and how. *Br Med Bull.* 1997; 53:617-631.

S

Sadler TW. Embriología médica. 7ª edición. Editorial Medica Panamerica. 1986.

Sandri M, Carraro U. Apoptosis of skeletal muscles during development and

disease. *Int J Biochem Cell Biol.* 1999; 31(12):1373-90.

Sarnat HB. Histopathology of SMA. In: Gamstorp I, Sarnat HB editors. In Progressive spinal atrophy. New York: Raven Press. 1983: p91-110.

Sato K, Eguchi Y, Kodama TS, Tsujimoto Y. Regions essential for the interaction between Bcl-2 and SMN, the spinal muscular atrophy disease gene product. *Cell Death Differ.* 2000; 7(4):374-83.

Scharf JM, Endrizzi MG, Wetter A, Huang S, Thompson TG, Zerres K, Dietrich WF, Wirth B, Kunkel LM. Identification of a candidate modifying gene for spinal muscular atrophy by comparative genomics. *Nat Genet.* 1998; 20:83-6.

Scheffer H, Cobben JM, Mensink RG, Stulp RP, van der Steege G, Buys CH. SMA carrier testing-validation of hemizygous SMN exon 7 deletion test for the identification of proximal spinal muscular atrophy carriers and patients with a single allele deletion. *Eur J Hum Genet.* 2000; 8(2):79-86.

Schmalbruch H, Jensen M, Bjaerg M, Kamieniecka Z, Kurland L. A new mouse mutant with progressive motor neuropathy. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1991; 50:192-204.

Schmalbruch H, Haase G. Spinal muscular atrophy: Present state. *Brain Pathology.* 2001; 11:231-47.

Schrank B, Gotz R, Gunnerson JM, Ure JM, Toyka K, Smith A, 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*. 1997; 94:9920-5.

Schreiber E, Tobler A, Molipiero U, Schaffner W, Fontana A. cDNA cloning of human N-Oct-3, a nervous system specific POU domain transcription factor binding to the octamer DNA motif. *Nucleic Acids Res*. 1993; 21:253-8.

Schwartz LM, Smith SW, Jones MEE, Osborne BA. Do all programmed cell deaths occur via apoptosis? *Proc Natl Acad Sci USA*. 1993; 90:980-4.

Shimohama S, Fujimoto S, Sumida Y, Tanino H. Differential expression of rat brain bcl-2 family proteins in development and aging. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998; 9;252(1):92-6.

Skordis LA, Dunckley MG, Yue B, Eperon IC, Muntoni F. Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003; 1;100(7):4114-9.

Sillevis Smitt PA, de Jong JM. Animal models of amyotrophic lateral sclerosis and the spinal muscular atrophies. *J Neurol Sci*. 1989; 91(3):231-58.

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*. 2000; 59(5):398-407.

Strasswimmer J, Lorson CL, Breiding DE, Chen JJ, Le T, Burghes AH, Androphy

EJ. Identification of survival motor neuron as a transcriptional activator-binding protein. *Hum Mol Genet*. 1999; 8(7):1219-26.

Szabo A, Dalmau J, Manley G, Rosenfeld M, Wong E, Henson J, Posner JB, Furneaux HM. HuD, a paraneoplastic encephalomyelitis antigen, contains RNA-binding domains and is homologous to ELAV and sex-lethal. *Cell*. 1991; 67:325-33.

T

Taylor J, Thomas NH, Lewis CM, Abbs S, Rodrigues NR, Davies KE, Mathew CG. Correlation of *SMN₁* and *SMN₂* gene copy number with age of onset and survival in spinal muscular atrophy. *Eur J Hum Genet*. 1998; 6:467-74.

Tews DS, Goebel HH. DNA fragmentation and Bcl-2 expression in infantile spinal muscular atrophy. *Neuromuscul Disord*. 1996; 6(4):265-73.

Tews DS, Goebel HH. Apoptosis-related proteins in skeletal muscle fibers of spinal muscular atrophy. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1997; 56(2):150-6.

Tizzano EF, Cabot C, Baiget M. Cell-specific survival motor neuron gene expression during human development of the central nervous system. *Am J Pathol*. 1998; 153:355-61.

Tizzano EF, Baiget M. Bases moleculares de la atrofia muscular espinal: el gen SMN. *Neurología*. 2000; 15:393.

V

Vaca K. The development of cholinergic neurons. *Brain Res*. 1988; 472(3):261-86.

van der Steege G, Grootcholten PM, van der Vlies P, Draaijers TG, Osinga J, Cobben JM, Scheffer H, Buys CH. PCR-based DNA test to confirm clinical diagnosis of autosomal recessive spinal muscular atrophy. *Lancet*. 1995; 345:985-6.

van der Zee EA, Luiten PG. Muscarinic acetylcholine receptors in the hippocampus, neocortex and amygdala: a review of immunocytochemical localization in relation to learning and memory. *Prog Neurobiol*. 1999; 58(5):409-71.

Vekrellis K, McCarthy MJ, Watson A, Whitfield J, Rubin LL, Ham J. Bax promotes neuronal cell death and is downregulated during the development of the nervous system. *Development*. 1997; 124(6):1239-49.

Violet L, Bertray S, Bueno-Brunialti AL, Lefebvre S, Burlet P, Clermont O, Cruaud C, Guenet J-L, Munnich A, Melki J. cDNA isolation, expression and chromosomal localization of the mouse survival motor neuron gene (Smn). *Genomics*. 1997; 40:185-188.

Vogelbaum MA, Tong JX, Rich KM. Developmental regulation of apoptosis in dorsal root ganglion neurons. *J Neurosci*. 1998; 18(21):8928-35.

Vyas S, Bechade C, Riveau B, Downward J, Triller A. Involvement of survival motor neuron (SMN) protein in cell death. *Hum Mol Genet*. 2002; 11(22):2751-64.

W

Wetts R, Vaughn JE. Differential vulnerability of two subsets of spinal motor neurons in amyotrophic lateral sclerosis. *Exp Neurol*. 1996; 141:248-55.

Whitehead SE, Jones KW, Zhang X, Cheng X, Terns RM, Terns MP. Determinants of the interaction of the spinal muscular atrophy disease protein SMN with the dimethylarginine-modified box H/ACA small nucleolar ribonucleoprotein GAR1. *J Biol Chem*. 2002; 277(50):48087-93.

Whitehouse PJ, Price DL, Struble RG, Clark AW, Coyle JT, Delon MR. Alzheimer's disease and senile dementia: loss of neurons in the basal forebrain. *Science*. 1982; 215:1237-9.

Wijsman JH, Jonker RR, Keijer R, Van de Velde CJH, Cornelisse CJ, Van Dierendonck JH. A new method to detect apoptosis in paraffin sections: in situ end labeling of fragmented DNA. *J Histochem Cytochem*. 1993; 41:7-12.

Williams BY, Vinnakota S, Sawyer CA, Waldrep JC, Hamilton SL, Sarkar HK. Differential subcellular localization of the survival motor neuron protein in spinal cord and skeletal muscle. *Biochem Biophys Res*. 1999; 254:10-4.

Williams BY, Hamilton SL, Sarkar HK. The survival motor neuron protein interacts with the transactivator FUSE binding protein from human fetal brain. *FEBS Lett*. 2000; 244:207-10.

Wirth B, Schmidt T, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Krawczak M, Müller-Miyshok B, Schönling J, Zerres K. De novo rearrangements found in 2% of index patients with spinal muscular atrophy: Mutational mechanisms, parental origin, mutation rate and implications for genetic counselling. *Am J Hum Genet*. 1997; 61:1102-11.

Wirth B, Herz M, Wetter A, Moskau S, Hahnen E, Rudnik-Schoneborn S, Wienker T, Zerres K. Quantitative analysis of survival motor neuron copies: identification of subtle SMN1 mutations in patients with spinal muscular atrophy, genotype-phenotype correlation, and implications for genetic counseling. *Am J Hum Genet.* 1999; 64(5):1340-56.

Wirth B. An update of the mutation spectrum of the Survival Motor Neuron (SMN) gene in autosomal recessive Spinal Muscular Atrophy (SMA). *Hum Mutat.* 2000; 15:228-37.

Wu D, Hersh LB. Choline acetyltransferase: Celebrating its fiftieth year. *J Neurochem.* 1994; 62:1653-63.

Wyllie A. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980; 284:555-6.

Wyllie AH. Apoptosis: an overview. *Br Med Bull.* 1997; 53:451-5.

Xu DG, Crocker SJ, Doucet JP, St-Jean M, Tamai K, Hakim AM, Ikeda JE, Liston P, Thompson CS, Korneluk RG, MacKenzie A, Robertson GS. Elevation of neuronal expression of NAIP reduces ischemic damage in the rat hippocampus. *Nat Med.* 1997; 3:997-1004.

Y

Yachnis AT, Giovanini MA, Eskin TA, Reier PJ, Anderson DK. Developmental patterns of BCL-2 and BCL-X polypeptide expression in the human spinal cord. *Exp Neurol.* 1998; 150(1):82-9.

Young PJ, Man NT, Lorson CL, Le TT, Androphy EJ, Burghes AH, Morris GE. The exon 2b region of the spinal muscular atrophy protein, SMN, is involved in self-association and SIP1 binding. *Hum Mol Genet.* 2000; 22;9(19):2869-77.

Z

Zambrano N, De Renzis S, Minopoli G, Faraoni R, Donini V, Scaloni A, Cimino F, Rosso T. DNA-binding protein Pur alpha and transcription factor YY1 function as transcription activators of the neuron-specific FE65 gene promoter. *Biochem J.* 1997; 15;328(Pt1):293-300.

Zamzami N, Brenner C, Marzo I, Susin SA, Kroemer G. Subcellular and submitochondrial mode of action of Bcl-2-like oncoproteins. *Oncogene.* 1998; 30;16(17):2265-82.

Zhang ML, Lorson CL, Androphy EJ, Zhou J. An in vivo reporter system for measuring increased inclusion of exon 7 in SMN2 mRNA: potential therapy of SMA. *Gene Ther.* 2001; 8(20):1532-8.

Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001; 108(4 Suppl):S99-103.

