

## **DISPOSITIVO PER MISURARE IL TONO MUSCOLARE ASSIALE NELLA RIABILITAZIONE DELLA POSTURA**

*(RM2009A000667- Italia)*

Yuri Ivanenko

*Fondazione Santa Lucia*

Oggetto del presente trovato è un dispositivo attraverso il quale è possibile misurare il tono muscolare torsionale (assiale) del corpo durante la postura eretta con la possibilità di caratterizzare la distribuzione del tono e di misurare l'asimmetria del tono fra le due gambe.

La maggior parte dei disturbi motori si manifesta con delle alterazioni del tono muscolare. Storicamente, la caratterizzazione clinica del tono è stata un valido aiuto per definire la diagnosi, però i meccanismi che legano tale deficit motorio all'alterazione del tono muscolare non sono ancora conosciuti. Il tono muscolare viene tipicamente definito come la resistenza muscolare, di un arto, durante un movimento passivo. Tuttavia la misura di tale resistenza muscolare è abbastanza diretta in quanto i muscoli appendicolari risultano sempre orientati verso l'asse meccanico dell'arto implicato e le rotazioni articolari sono sempre proporzionali ai cambi di lunghezza della muscolatura ad essa associata. Quindi, la maggior parte del nostro sapere viene dagli studi effettuati sulla misura del tono solamente sugli arti.

Tuttavia, anche i muscoli assiali del tronco, che sono numericamente consistenti nell'apparato muscolare, hanno un ruolo importante per il tono posturale. Infatti, essi presentano differenze con quelli degli arti per le loro caratteristiche morfo-funzionali e per la loro innervazione. Pertanto è importante sapere come il tono muscolare viene generato e distribuito nei muscoli assiali e prossimali del tronco, poiché il tono posturale può essere diverso fra i muscoli prossimali e distali. La muscolatura assiale ha una struttura piuttosto complessa. Essa comprende, in direzione cefalo-caudale, i muscoli della testa, del collo, del rachide, del tronco, dell'addome, della pelvi e quelli del cingolo scapolare. Molti di questi muscoli si estendono per tratti piuttosto lunghi e presentano inserzioni multiple coinvolgendo più comparti ossei: la colonna vertebrale, le coste, la pelvi e il cingolo scapolare. I fasci di questi muscoli si orientano con angoli diversi rispetto all'asse longitudinale (rostro-caudale) del tronco [Kiefer et al. 1998] e il loro controllo discendente avviene tramite un'ampia varietà di strutture corticali o sottocorticali [Kuypers 1981; Hounsgard et al. 1988; Holstege 1998; Hultborn 1999].

Dato che il tronco collega gambe, braccia e testa insieme, l'attività tonica assiale è fondamentale e deve prendere in considerazione l'azione di tutte le parti durante il mantenimento della postura o il movimento. Durante un movimento che interessa una sola parte del corpo, si determina un disequilibrio di tutte le altre parti non interessate. Per questo motivo, realizzare un movimento dei segmenti distali, richiede un'accurata abilità per stabilizzare dei segmenti prossimali [Hasan 2005; Hess 1943]. Il provvedere simultanea-

mente stabilità e mobilità per i gesti della vita quotidiana richiede di regolare costantemente l'attività assiale e prossimale del tono muscolare.

Malgrado l'importanza biomeccanica dei muscoli assiali per la postura ed il movimento, pochi studi si pongono l'obiettivo di valutare la regolazione e la distribuzione del tono per tale muscolatura. Pertanto considerando la grande quantità di funzioni e la complessa innervazione che caratterizza la muscolatura assiale e quella prossimale, il tono assiale potrebbe avere caratteristiche uniche.

A tale scopo è stato ideato un nuovo dispositivo di misura capace di valutare la distribuzione del tono assiale e il suo adattamento durante posizioni posturali differenti.

I soggetti sani potrebbero, per adeguarsi alle variazioni posturali, modificare la lunghezza dei muscoli prossimali ed assiali in funzione dei riflessi d'allungamento e d'accorciamento [Sherrington 1909]. Tali adattamenti potrebbero dimostrare l'elevata plasticità della muscolatura prossimale ed assiale (cambi in lunghezza e non in tensione) per il mantenimento della stabilità della testa, del tronco e della pelvi. È importante quindi comprendere i principi fondamentali della regolazione del tono posturale e i meccanismi del controllo posturale.

Il sistema di cui al presente trovato, atto a misurare il tono assiale, risulta essere particolarmente utile al fine di studiare il controllo motorio nei pazienti con diverse patologie del tono posturale (Ivanenko et al. 1999; Gurfinkel et al. 2006; Wright et al. 2007; Franzén et al. 2009).

Oggetto del presente trovato è un dispositivo in grado di quantificare il tono assiale a diversi livelli (collo, tronco, gambe) in posizione eretta; detto dispositivo permette di applicare una rotazione lenta per valutare in modo efficace, gli allungamenti e gli accorciamenti di muscoli obliqui del collo, dei muscoli addominali e di quelli della colonna vertebrale, senza spostare il centro di gravità e limitando la variazione della postura in qualsiasi direzione eccetto che nella torsione.

Il dispositivo di cui al presente trovato è composto da due piattaforme di forza, una per ogni piede, da una struttura flessibile che permette di fissare la mobilità della rotazione in diversi punti del corpo e da un sensore di coppia opportunamente disposto.

Il soggetto viene posizionato con i piedi sulle due piattaforme di forza che possono ruotare insieme (fig. 1A, E) o separatamente (fig. 1A, B, C, D, E). Per mezzo del sensore di coppia vengono misurate le coppie torcenti del corpo intero (fig. 1A), del collo (fig. 1C), del tronco (fig. 1D), del tronco e collo (fig. 1B) e del tronco e delle gambe (fig. 1E) derivanti dalle rotazioni alternate destra/sinistra ad una velocità inferiore ad 1°/s (inferiore alla soglia di attivazione del sistema vestibolare).

Il dispositivo di cui al presente trovato verrà ora descritto in forma schematica con riferimento ai disegni allegati in cui:

- La fig. 1A mostra schematicamente il presente trovato nella configurazione idonea a valutare il tono assiale dell'intero corpo.
- La fig. 1B mostra schematicamente il presente trovato nella configurazione idonea a valutare il tono assiale del tronco e del collo.

- La fig. 1C mostra schematicamente il presente trovato nella configurazione idonea a valutare il tono assiale del collo.
- La fig. 1D mostra schematicamente il presente trovato nella configurazione idonea a valutare il tono assiale del tronco
- La fig. 1E mostra schematicamente il presente trovato nella configurazione idonea a valutare il tono assiale del tronco e delle gambe
- La fig. 2 mostra schematicamente due metodi per il calcolo della coppia massima del tronco e del collo.

Con riferimento a dette figure il dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura risulta essere costituito da:

- due piattaforme di forza (1 e 2) rotanti idonee a fungere da appoggio per i piedi del soggetto;
- almeno una struttura flessibile (3) che permette di fissare la mobilità della rotazione in diversi punti del corpo del soggetto;
- almeno un sensore di coppia (4);
- corpetti con fasce, opportunamente conformati (6) di collegamento della struttura flessibile con le parti del corpo del paziente;
- cuscinetti assiali (5) posti: nei punti di fulcro della struttura flessibile (3), nei punti di collegamento della struttura flessibile (3) con le piattaforme (1 e 2); nei punti di giunzione della struttura flessibile con le fasce (6) di collegamento della struttura flessibile con le parti del corpo del soggetto.

Secondo il presente trovato, il soggetto si posiziona sopra le due piattaforme di forza (1 e 2), viene disposta la struttura flessibile (3) collegandola attraverso le fasce (6) ai diversi punti del corpo del soggetto come mostrato nelle fig. 1 (A, B, C, D, E), il soggetto quindi compie delle rotazioni alternate destra/sinistra ad una velocità inferiore ad 1°/s, inferiore quindi alla soglia di attivazione del sistema vestibolare, che assicura l'equilibrio del corpo registrando la posizione ed il movimento della testa nello spazio.

La struttura flessibile (3) fissando la mobilità alla rotazione di diversi punti del corpo (testa, spalle, bacino) attraverso le apposite fasce (6) per bacino e spalle ed il caschetto (8) per la testa, consente grazie anche alla interposizione del sensore di coppia (4) la misura del tono assiale.

Come si può rilevare dalle figure, in alcuni casi parte della struttura flessibile (3) è ancorata ad un piano (7) disposto sopra la testa del soggetto parallelamente al pavimento sul quale poggiano le piattaforme di forza rotanti (1 e 2).

Nei casi mostrati nella figura 2A, nella misurazione del momento torcente massimo del tronco, il paziente è in posizione supina ed ha la testa ancorata al sensore di coppia (4) per mezzo della fascia (6) mentre le spalle ed il bacino sono ancorati attraverso le fasce (6) alla struttura flessibile (3).

Nella fig. 2B che mostra la misurazione del momento torcente massimo del collo, il paziente è supino ha la testa ancorata al sensore di coppia (4) attraverso il caschetto (8) ed il bacino ancorato alla struttura flessibile (3) attraverso la fascia (6).

Per lasciare libertà di movimento in direzione antero-posteriore, sono stati posti dei cuscinetti assiali (5) tra le barre che compongono la struttura

flessibile (3), tra la barra inferiore e le piattaforme (1 e 2) e tra le barre superiori e le fasce (6).

In questo modo la struttura flessibile (3) non permette rotazioni fra la piattaforma e i punti di fissaggio (B, C, D) o fra il soffitto e le spalle (D, E). Nei casi mostrati nelle figure 1A e 1E le piattaforme possono ruotare insieme o separatamente al fine di valutare se il tono è asimmetrico quando viene imposta una rotazione di una gamba indipendentemente dall'altra. Negli altri casi (B, C, D) ruotano insieme.

Il dispositivo di cui al presente trovato permette quindi di applicare una rotazione lenta per valutare in modo efficace gli allungamenti e gli accorciamenti di muscoli obliqui del collo, dei muscoli addominali e di quelli della colonna vertebrale senza spostare il centro di gravità e limitando la variazione della postura in qualsiasi direzione eccetto che quella in torsione.

## RIVENDICAZIONI

1. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura caratterizzato dal fatto di essere composto da:

- due piattaforme di forza (1 e 2) rotanti idonee a fungere da appoggio per i piedi del soggetto;
- almeno una struttura flessibile (3) che permette di fissare la mobilità della rotazione in diversi punti del corpo del soggetto;
- almeno un sensore di coppia (4);
- corpetti con fasce, opportunamente conformati (6) di collegamento della struttura flessibile con le parti del corpo del paziente;
- cuscinetti assiali (5) nei punti di fulcro della struttura flessibile (3), nei punti di collegamento della struttura flessibile (3) con le piattaforme (1 e 2), nei punti di giunzione della struttura flessibile con le fasce (6) di collegamento della struttura flessibile con le parti del corpo del soggetto;

detto dispositivo consentendo di applicare una rotazione lenta del corpo del soggetto per la valutazione degli allungamenti e degli accorciamenti dei muscoli obliqui del collo, dei muscoli addominali e di quelli della colonna vertebrale, senza spostare il centro di gravità e limitando la variazione della postura in qualsiasi direzione eccetto che quella in torsione.

2. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che le rotazioni effettuate dal soggetto in esame vengono compiute ad una velocità inferiore ad 1°/s ossia inferiore alla soglia di attivazione del sistema vestibolare.

3. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che le piattaforme di forza (1, 2) possono ruotare insieme o separatamente al fine di valutare se il tono è asimmetrico quando viene imposta una rotazione di una gamba indipendentemente dall'altra.

4. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che la misurazione degli allungamenti dei muscoli avviene attraverso la rilevazione del

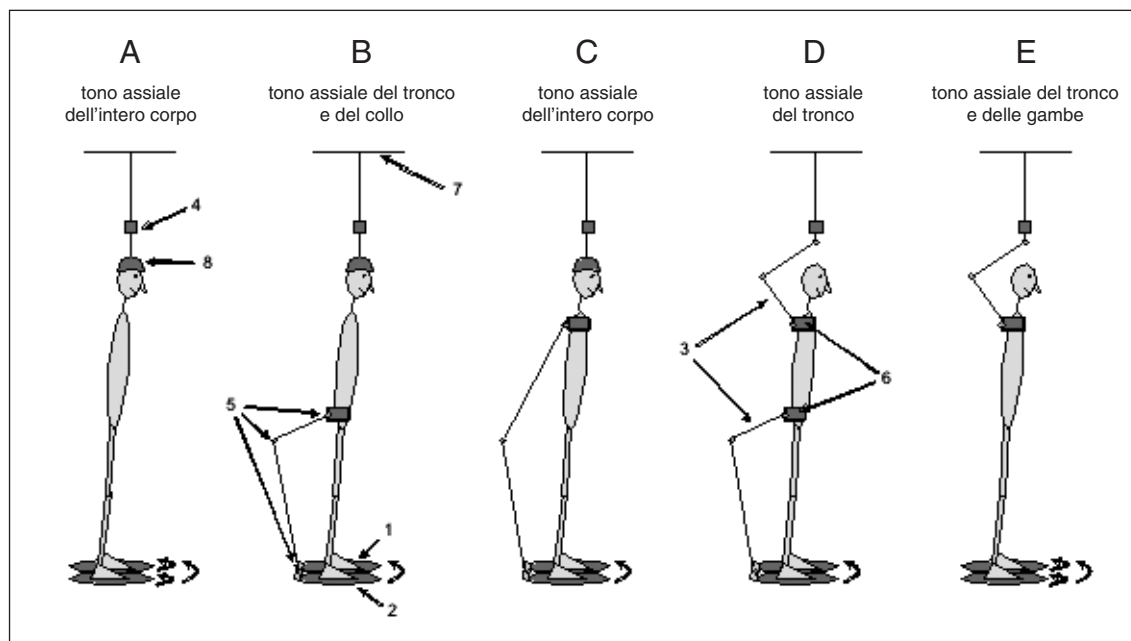


Fig. 1

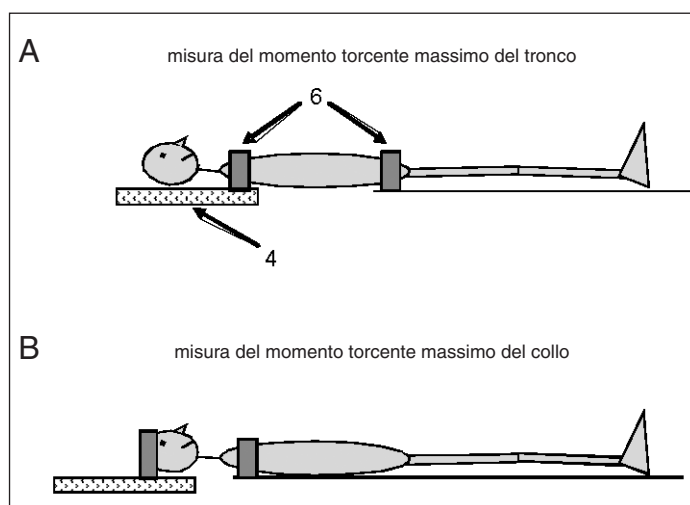


Fig. 2

momento torcente effettuata dal sensore di coppia (4).

5. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che parte della struttura flessibile (3) è ancorata ad un piano (7) disposto sopra la testa del soggetto parallelamente al pavimento sul quale poggiano le piattaforme di forza rotanti (1 e 2).

6. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che nella misurazione del momento torcente massimo del tronco, il paziente è in posizione supina ed ha la testa ancorata al sensore di coppia (4) per mezzo della fascia (6) mentre le spalle ed il bacino sono ancorati attraverso le fasce (6) alla struttura flessibile (3).

7. Dispositivo per misurare il tono muscolare assiale nella riabilitazione della postura secondo la rivendicazione 1 caratterizzato dal fatto che nella misurazione del momento torcente massimo del collo, il paziente è supino, ha la testa ancorata al sensore di coppia (4) attraverso la fascia (6) e le spalle ancorate alla struttura flessibile (3) attraverso la fascia (6).

## **USO DEI MUTANTI DOMINANTI NEGATIVI DI SAM68 PER IL TRATTAMENTO DELLA SMA**

*(RM2009A000021 – Italia)*

Maria Paola Paronetto, Simona Pedrotti  
*Fondazione Santa Lucia*

La presente invenzione si riferisce all'uso di mutanti dominanti negativi di Sam68 per la produzione di un medicamento per il trattamento dell'atrofia muscolare spinale, ad acidi nucleici codificanti per tali mutanti e a vettori e metodi correlati ad essi.

### **STATO DELLA TECNICA**

L'Atrofia Muscolare Spinale (SMA) è una malattia neurodegenerativa autosomica recessiva che rappresenta la causa genetica primaria di mortalità infantile, con un'incidenza di 1 su 6000 nella popolazione umana. La SMA può essere classificata in tre tipi a seconda della severità della malattia, con il tipo I che rappresenta la forma più severa ed il tipo III la forma più lieve [Zerres, Rudnik-Schonenberg 1995]. La SMA è caratterizzata dalla degenerazione dei motoneuroni nelle corna anteriori della spina dorsale e conseguente atrofia dei muscoli scheletrici [Monani 2005].

La causa genetica della SMA è la perdita omozigote di SMN1, un gene localizzato nella regione telomerica del cromosoma 5 che codifica per la proteina di "sopravvivenza dei motoneuroni" (chiamata d'ora in avanti proteina SMN o SMN). È da notare che tutti i pazienti affetti da SMA mantengono almeno una copia del gene quasi identico centromerico SMN2. Sebbene SMN2 codifichi per una proteina virtualmente identica, i livelli di espressione di questo gene non sono sufficienti a ripristinare l'attività di SMN [Monani 2005].

L'instabilità della proteina SMN2 è dovuta a una singola sostituzione, da C a T in posizione +6 nell'esone 7, che è silente dal punto di vista traduzionale ma causa l'eliminazione di questo esone nella maggior parte dei trascritti SMN2 [Lorson et al. 1999; Monani et al. 1999]. La proteina che ne risulta non consente la sopravvivenza e la funzione dei motoneuroni- $\alpha$  spinali, causando di conseguenza la malattia. Per questa ragione, la regolazione dello splicing alternativo dell'mRNA di SMN2 rappresenta un importante modello clinico per investigare l'impatto della regolazione dello splicing nelle patologie umane [Cartegni et al. 2002; Pellizzoni 2007; Wang, Cooper 2007]. Sono stati proposti due modelli per spiegare l'effetto causato dalla sostituzione da C a T nell'esone 7 di SMN2.

Cartegni e Krainer [2002] hanno proposto che questa transizione distrugge un sito esonico di attivazione dello splicing (ESE) e impedisce il legame del fattore di splicing ASF/SF2, non consentendo il riconoscimento dell'esone. Al contrario, un modello alternativo propone che il singolo cambia-

mento nucleotidico crei un sito esonico di repressione dello splicing (ESS) cui si lega la proteina inibitrice dello splicing hnRNP A1, favorendo in questo modo l'esclusione dell'esone 7 dal pre-mRNA di SMN2 [Kashima, Manley 2003].

Quest'ultimo modello è ulteriormente validato dall'osservazione che hnRNP A1, ma non ASF/SF2, interagisce fortemente con l'esone 7 di SMN2 e che il suo effetto sull'esclusione dell'esone è altamente specifico [Kashima et al. 2007]. Un regolatore positivo dell'inclusione dell'esone 7 che agisce in maniera antagonista rispetto ad hnRNP A1, è il fattore di splicing TRA2 $\beta$  [Hofmann et al. 2000; Chang et al. 2001], e ciò indica come i livelli di espressione relativi di specifici fattori di splicing possano fortemente modificare lo splicing alternativo del pre-mRNA di SMN2.

In alcuni individui affetti da SMA, il gene SMN2 può essere replicato fino a quattro volte e la presenza di copie addizionali di geni SMN2 può aiutare a rimpiazzare la proteina necessaria per la sopravvivenza dei motoneuroni. Ne risulta che individui con più copie di questo gene presentano sintomi meno severi.

Non essendo disponibile alcuna cura per la SMA e il suo trattamento è focalizzato soltanto sul controllo farmacologico dei sintomi, ancora scarsamente efficiente, si avverte la necessità quindi di trovare delle terapie nuove per il trattamento di questa malattia.

## **SOMMARIO DELL'INVENZIONE**

È uno scopo della presente invenzione fornire l'uso di un mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1 per la produzione di un medicamento per il trattamento della SMA.

È un altro scopo della presente invenzione fornire l'uso del mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1 per la produzione di un medicamento per il trattamento della SMA così che è ripristinata l'espressione della proteina SMN (survival motor neuron protein) nelle cellule di un individuo affetto da SMA.

È un ulteriore scopo della presente invenzione fornire un vettore per terapia genica comprendente un acido nucleico codificante per un mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1.

È un ulteriore scopo della presente invenzione fornire un mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1 per uso nel trattamento della SMA.

Infine, è uno scopo della presente invenzione fornire un metodo per ripristinare l'espressione della proteina SMN nelle cellule di un individuo affetto da atrofia muscolare spinale per il trattamento della SMA comprendente somministrare un polipeptide e/o un acido nucleico mutante dominante negativo di Sam68 a dette cellule.

## **DEFINIZIONI**

Usato in questo contesto, il termine "mutante dominante negativo" di una proteina si riferisce ad un polipeptide o ad un acido nucleico mutante,

che manca dell'attività wild-type e che, una volta espresso in una cellula in cui è anche espressa la forma wildtype della stessa proteina, domina la proteina wild-type e compete effettivamente con le proteine wild-type per substrati, ligandi, etc., inibendo di conseguenza l'attività della molecola wild-type.

In particolare, con il termine "polipeptide mutante" si intende qualsiasi polipeptide o rappresentazioni di esso che differiscono dal corrispondente polipeptide wild-type per almeno una sostituzione aminoacidica, aggiunta o delezione, per esempio l'aggiunta di una glutamina, preferibilmente che consista di una sostituzione di un aminoacido.

I polipeptidi mutanti preferiti per quanto riguarda la presente invenzione, differiscono dal loro corrispondente polipeptide wild-type per avere una o due sostituzioni aminoacidiche o per avere delezioni nel dominio N-terminale compreso il dominio GSG.

Il termine "dominio GSG" si riferisce a una regione altamente conservata (GRP33/Sam68/GLD1) che è richiesta per la omodimerizzazione e per il legame all'RNA.

Come qui usato, il termine "Sam68" si riferisce alla proteina della SEQ ID NO:1.

Come qui usato, il termine "Sam68V229F" si riferisce alla proteina della SEQ ID NO:2.

Come qui usato, il termine "Sam68NLS-KO" si riferisce alla proteina della SEQ ID NO:3.

Come qui usato, il termine "Sam68351-443" si riferisce alla proteina della SEQ ID NO:4.

Come qui usato, il termine "Sam68-DNA" si riferisce al DNA della SEQ ID NO:5.

Come qui usato, il termine "Sam68V229F-DNA" si riferisce al DNA della SEQ ID NO:6.

Come qui usato, il termine "Sam68NLS-KO-DNA" si riferisce al DNA della SEQ ID NO:7.

Come qui usato, il termine "Sam68351-443-DNA" si riferisce al DNA della SEQ ID NO:8.

### **Breve descrizione delle figure**

La presente invenzione sarà ora descritta con riferimento alle figure che la accompagnano, dove:

– La *Figura 1* mostra i risultati dell'induzione da parte di Sam68 dell'esclusione dell'esone 7 dal pre-mRNA di SMN2.

(A) Le sequenze dell'esone 7 di SMN1 e SMN2 sono rappresentate schematicamente e la transizione da C a T è evidenziata in grassetto. I putativi siti di legame per Sam68 e hnRNP A1 nell'esone 7 di SMN2 sono indicati. (B-E). I saggi di splicing sono stati condotti cotrasfettando 0,5 µg del minigene pCI-SMN2 e quantità crescenti di GFP-Sam68 (B), GFP-hnRNP A1 (C), pCDNA3-Tra2β (D), Flag-ASF/SF2 (E) o si-Sam68 dsRNAs o si-Scrambled dsRNAs (F) in cellule HEK293T. Le cellule sono state raccolte 24 ore dopo la trasfezione e

1 µg di RNA totale è stato utilizzato negli esperimenti di RT-PCR. È stata effettuata l'analisi mediante Western blot di ciascun esperimento. È stata eseguita l'analisi densitometrica del rapporto tra  $\Delta$ exon7/full length SMN2 utilizzando il programma ImageQuant5.

– La *Figura 2* mostra i risultati relativi alla necessità dell'attività di legame di Sam68 all'RNA di SMN2 per l'esclusione dell'esone 7.

(A) Diagramma schematico che rappresenta la proteina STAR (signal transduction and activation of RNA) Sam68 e le mutazioni introdotte nel dominio di legame all'RNA (V229F) e nel segnale di localizzazione nucleare (NLS; R436/442A). (B) Saggio di splicing del minigene SMN2 in cellule HEK293 co-trasfettate con i costrutti indicati. Le cellule sono state raccolte dopo 24 ore dalla trasfezione e processate per gli esperimenti di RT-PCR (pannello in alto). Gli estratti cellulari degli stessi campioni sono stati analizzati mediante Western blot (pannello in basso) per la GFP (in alto) e la tubulina (in basso) come controllo di caricamento. L'analisi densitometrica degli esperimenti di RT-PCR è mostrata sotto. (C) Diagramma schematico dell'esone 7 di SMN2 che mostra le mutazioni introdotte nei putativi siti di legame per Sam68 e hnRNP A1. Sono mostrate le analisi di RT-PCR del saggio di splicing condotto in presenza o assenza di GFP-Sam68 (pannello in alto) o GFP-hnRNP A1 (pannello in basso) trasfettate. L'analisi densitometrica è mostrata dai grafici a barre.

– La *Figura 3* mostra la cooperazione tra Sam68 e hnRNP A1 nell'esclusione dell'esone 7 di SMN2.

(A) Cellule HEK293T sono state trasfettate con siRNA di controllo, per Sam68 o per hnRNP A1 da soli o in combinazione. Dopo 24 ore, le cellule sono state trasfettate con il minigene pCI-SMN2 e analizzate mediante RT-PCR per lo splicing alternativo. L'analisi densitometrica del saggio di splicing è mostrata sotto. L'analisi mediante Western blot per Sam68 e hnRNP A1 è mostrata sopra l'analisi di PCR. (B) Cellule HEK293T sono state trasfettate con pCI-SMN2 e plasmidi codificanti per TRA2 $\beta$ , Sam68 o hnRNP A1, utilizzati da soli o in combinazione. Dopo 24 ore, le cellule sono state analizzate mediante RT-PCR per lo splicing alternativo. L'analisi densitometrica del saggio di splicing è mostrato sotto. L'analisi mediante Western blot per TRA2 $\beta$ , Sam68 e hnRNP A1 è mostrata sopra l'analisi per PCR.

– La *Figura 4* mostra il ripristino dell'inclusione dell'esone 7 in SMN2 in cellule trasfettate con Sam68 wild-type o con hnRNP A1.

(A) Cellule HEK293T sono state trasfettate con pCI-SMN2 e con un plasmide codificante per GFP-Sam68 da solo o in combinazione con plasmidi codificanti per TRA2 $\beta$ , GFP-Sam68V229F o GFP-Sam68351-443. Dopo 24 ore, le cellule sono state analizzate mediante RT-PCR per lo splicing alternativo. L'analisi densitometrica del saggio di splicing è mostrata sotto. (B) Cellule HEK293T sono state trasfettate con pCISMN2 e un plasmide codificante GFP-hnRNP A1 da solo o con plasmidi codificanti per TRA2 $\beta$ , GFP-Sam68V229F o GFP-Sam68351-443. Dopo 24 ore le cellule sono state analizzate mediante RT-PCR per lo splicing alternativo. L'analisi densitometrica del saggio di splicing è mostrata sotto.

– La *Figura 5* mostra l'accumulo della proteina SMN2 e le gemme di SMN in cellule SMA causate da Sam68 Sam68V229F or GFP-Sam68351-443.

(A) Fibroblasti derivati da pazienti SMA (GM00232) sono stati infettati con retrovirus codificanti GFP, GFP-Sam68V229F o GFP-Sam68351-443. Dopo selezione mediante sorting per il segnale GFP, le cellule sono state analizzate mediante RT-PCR per i trascritti endogeni di SMN2. L'analisi densitometrica è riportata sotto il pannello. (B) Analisi mediante Western blot per SMN, le proteine di fusione con la GFP e la tubulina dei campioni analizzati in (A). Fibroblasti GM03814 wild-type sono mostrati come controllo (C). Analisi mediante immunofluorescenza di SMN in cellule analizzate in (B). La posizione delle gemme nucleari formate da SMN è indicata dalle frecce.

## DESCRIZIONE DETTAGLIATA DELL'INVENZIONE

Secondo la presente invenzione, un mutante dominante negativo di Sam68 è utilizzato per la produzione di un medicamento, in particolare per il trattamento della SMA, così che è ripristinata l'espressione della proteina SMN nelle cellule di un individuo affetto da SMA.

In una forma di realizzazione, il mutante dominante negativo di Sam68 comprende almeno una sostituzione amminoacidica nella regione corrispondente agli amminoacidi 81 a 276. Più preferibilmente, detta almeno una sostituzione amminoacidica è da valina a fenilalanina in corrispondenza della posizione 229.

In un'altra forma di realizzazione, il mutante dominante negativo di Sam68 comprende almeno una sostituzione amminoacidica nella regione corrispondente agli amminoacidi 419 a 443, preferibilmente il mutante dominante negativo ha una sostituzione amminoacidica da arginina ad alanina in corrispondenza della posizione 436 e/o una sostituzione amminoacidica da arginina ad alanina in corrispondenza della posizione 442.

In un'altra forma di realizzazione, il mutante dominante negativo di Sam68 consiste degli amminoacidi 351-443.

In un'altra forma di realizzazione, il mutante dominante negativo di Sam68 è codificato da un acido nucleico.

In un'altra forma di realizzazione l'acido nucleico codificante per il mutante dominante negativo di Sam68 è incluso in un vettore per terapia genica.

Infine, secondo la presente invenzione un metodo per ripristinare l'espressione della proteina SMN nelle cellule di un individuo affetto da atrofia muscolare spinale per il trattamento della SMA comprende somministrare un polipeptide e/o acido nucleico mutante dominante negativo di Sam68 a dette cellule.

L'analisi della sequenza dell'esone 7 di SMN2 ha messo in evidenza la presenza di un putativo sito di legame per la proteina STAR (signal transduction and activation of RNA) Sam68 subito a monte della sequenza consenso per hnRNP A1. È stato recentemente dimostrato che Sam68 è in grado di regolare lo splicing alternativo di geni bersaglio come CD44 e

BCL2L1 (Matter et al. 2002; Paronetto et al. 2007). Inoltre, è stato dimostrato che Sam68 e hnRNP A1 associano fisicamente e cooperano nella regolazione dello splicing alternativo di BCL2L1 (Paronetto et al. 2007). Qui, è stato investigato se Sam68 gioca un ruolo nella regolazione dello splicing alternativo di SMN2 e se la sua funzione richiede un'associazione con hnRNP A1. I risultati indicano che Sam68 causa l'esclusione dell'esone 7 di SMN2 e che interferire con la sua capacità di legare l'RNA o di associare con hnRNP A1 in cellule vive ripristina l'inclusione dell'esone 7 e promuove l'accumulazione di una proteina SMN funzionale in cellule di pazienti SMA. Quindi, Sam68 è un nuovo regolatore dello splicing alternativo di SMN2 che può modificare la severità della malattia e rappresenta un potenziale bersaglio per un approccio terapeutico della SMA.

*Sam68 altera lo splicing alternativo dell'esone 7 di SMN2* – La transizione da C a T in posizione +6 nell'esone 7 (sottolineata) crea un potenziale sito di legame per Sam68 (UUUUA) subito a monte del sito di legame per hnRNP A1 (UAGACA) nel pre-mRNA di SMN2 (Fig. 1A). Per determinare se effettivamente Sam68 sia in grado di modulare lo splicing alternativo dell'esone 7 di SMN2, sono stati condotti saggi di splicing *in vivo*, utilizzando un minigene che comprende l'intera sequenza interessata dallo splicing alternativo, dall'esone 6 all'esone 8, del gene SMN2 umano (Stoss et al. 2004). La co-trasfezione del minigene di SMN2 insieme a dosi crescenti di GFP-Sam68 determinano l'esclusione dell'esone 7 in maniera dose-dipendente (Fig. 1B). L'effetto esercitato da Sam68 è stato simile a quello ottenuto con simili quantità crescenti di GFP-hnRNP A1 (Fig. 1C), un noto induttore dell'esclusione dell'esone 7 di SMN2 (Kashima, Manley 2003). D'altro canto, la up regolazione di TRA2 $\beta$  esplica l'effetto opposto ed incrementa l'inclusione dell'esone 7 (Fig. 1D) mentre ASF/SF2 non ha avuto effetto sullo splicing alternativo di SMN2 (Fig. 1E). Per confermare il ruolo di Sam68 sullo splicing alternativo di SMN2, le HEK293 sono state trasfettate con RNA a doppio filamento siSam68 per depletare la proteina endogena o con un RNA a doppio filamento si-Scrambled come controllo. La trasfezione del minigene di SMN2 ha indicato che la down regolazione di Sam68 causa un incremento nell'inclusione dell'esone 7 rispetto alle cellule di controllo (Fig. 1F). Questi risultati indicano che Sam68 è un fattore di splicing che modifica in maniera specifica lo splicing alternativo dell'esone 7 di SMN2.

*L'attività di legame all'RNA di Sam68 è richiesta per l'esclusione dell'esone 7 di SMN2* – Poiché è presente un sito consenso per Sam68 nel pre-mRNA di SMN2, sono stati condotti esperimenti per valutare se l'attività di legame all'RNA di Sam68 sia richiesta per l'esclusione dell'esone 7.

Sono stati utilizzati due differenti mutanti di Sam68 (Fig. 2A):

– l'allele V229F, che porta una mutazione puntiforme nel dominio GSG di legame all'RNA, e l'allele NLS-KO, che contiene mutazioni nel segnale di localizzazione nucleare (NLS) e inficia fisicamente l'abilità di Sam68 di modulare lo splicing nel nucleo (Paronetto et al. 2007).

Come mostrato nella Fig. 2B, entrambe le mutazioni sopprimono completamente la capacità di Sam68 di indurre l'esclusione dell'esone 7, dimo-

strando che il legame all'RNA e la localizzazione nucleare di Sam68 sono richieste per questo evento. Per determinare se Sam68 esercita il suo effetto attraverso il legame alla sequenza consenso UUUUA creata dalla transizione da C a T nell'esone 7, le T in posizione +4 e +5 sono state sostituite con G (mutante TT-GG) per distruggere questo potenziale sito di legame. Inoltre, la A in posizione +7 è stata sostituita con una C per distruggere i siti consenso sia di Sam68 che di hnRNP A1 (mutante A-C) oppure la A e la C in posizione +9 e +10 sono state sostituite con una T e una G rispettivamente (mutante AC-TG), che dovrebbe avere effetto solo sul legame di hnRNP A1. Le mutazioni sono state introdotte nel minigene di SMN2 e testate per la loro attività in esperimenti di co-trasfezione.

Come mostrato in Fig. 2C, la mutazione del putativo sito di legame di Sam68 indebolisce fortemente l'esclusione dell'esone 7 e sopprime completamente l'effetto di Sam68 sullo splicing alternativo di SMN2, indicando che questa sequenza è richiesta per l'esclusione dell'esone 7 indotta da Sam68. Una soppressione ancora più forte dell'esclusione dell'esone 7 è stata ottenuta mutando la A in posizione +7, che distrugge la sequenza consenso sia per Sam68 che per hnRNP A1. Anche in questo caso, la up-regolazione di Sam68 non ha avuto effetto sullo splicing alternativo dell'esone, ha soppresso l'eliminazione dell'esone 7 e ha abolito l'effetto della up-regolazione di entrambi i fattori di splicing. D'altro canto, quando sono state introdotte mutazioni nella regione contenente il sito di legame per hnRNP A1, Sam68 può ancora indurre l'esclusione dell'esone 7 (Fig. 2C). Saggi di splicing simili sono stati condotti con hnRNP A1. È importante sottolineare l'osservazione di un comportamento complementare di questo fattore di splicing. La up-regolazione di hnRNP A1 è in grado di indurre l'esclusione dell'esone 7 quando il sito di legame per Sam68 viene mutato, mentre il suo effetto viene fortemente indebolito dal mutante AC-TG. Tuttavia, una completa inibizione dell'esclusione dell'esone anche in cellule che sovraesprimono Sam68 o hnRNP A1 è stata ottenuta solo quando entrambi i siti consenso sono stati mutati sostituendo la A in posizione 7 con una C (Fig. 2C). Questi risultati indicano fortemente che Sam68 e hnRNP A1 legano siti strettamente vicini ma distinti e che entrambe le proteine sono richieste per una eliminazione efficiente dell'esone dal pre-mRNA.

*Sam68 e hnRNP A1 cooperano nell'eliminazione dell'esone 7 di SMN2* – Gli esperimenti sopra riportati dimostrano che il legame di Sam68 è richiesto per l'esclusione dell'esone 7 e suggeriscono che un'azione concertata di Sam68 e hnRNP A1 è richiesta per questo evento. Per studiare ulteriormente la possibile cooperazione tra Sam68 e hnRNP A1 nello splicing alternativo di SMN2, le proteine endogene sono state depletate mediante RNAi. Quando le cellule HEK293 sono state trasfettate con siRNA per Sam68 o hnRNP A1, è stata osservata una piccola ma riproducibile diminuzione nell'eliminazione dell'esone 7 in SMN2 (Fig. 3A). È da notare che quando entrambe le proteine sono state silenziate contemporaneamente, è stato osservato un effetto sinergico sull'inclusione dell'esone 7 (Fig. 3A), suggerendo che Sam68 e hnRNP A1 cooperano nel promuovere l'esclusione dell'esone 7.

Come approccio alternativo per vagliare la cooperazione tra questi due regolatori dello splicing, è stata testata la loro capacità di contrapporsi all'azione di TRA2 $\beta$ , un regolatore positivo dell'inclusione dell'esone 7 di SMN2. È stato osservato che la coespressione di Sam68 o hnRNP A1 sono in grado di inibire l'inclusione dell'esone 7 indotta da TRA2 $\beta$ . Tuttavia, co-esprimendo Sam68 e hnRNP A1 insieme, è stato osservato un effetto più che additivo e l'inclusione dell'esone 7 è stata quasi completamente soppressa anche in presenza di un eccesso di TRA2 $\beta$  (Fig. 3B). Questi risultati indicano ulteriormente che Sam68 e hnRNP A1 cooperano nell'indurre l'esclusione dell'esone 7 di SMN2.

*Mutazioni che interferiscono con l'attività di Sam68 ripristinano l'inclusione dell'esone 7 nel pre-mRNA di SMN2* – Sam68 funziona come dimero *in vivo* (Richard 1999) e interagisce con hnRNP A1 con i suoi 93 aminoacidi carbossiterminali (Paronetto et al. 2007). Se Sam68 e hnRNP A1 cooperano nel promuovere l'esclusione dell'esone 7, interferire con questa funzione di Sam68 potrebbe limitare o invertire questo effetto sullo splicing alternativo di SMN2. In linea con questa ipotesi, è stato osservato che Sam68<sub>V229F</sub>, che è difettivo nell'attività di legame all'RNA ma omodimerizza con la Sam68 endogena, sopprime completamente l'esclusione dell'esone 7 quando overespresso in cellule HEK293 (Fig. 2B), suggerendo che agisca da dominante negativo di Sam68, i.e. interagisce con la Sam68 endogena sequestrandola in domini non funzionali. Un risultato simile sull'inclusione dell'esone 7 è stato ottenuto overesprimendo Sam68<sub>351-443</sub>, una forma nucleare tronca di Sam68 che contiene il sito di legame per hnRNP A1 ma manca del dominio di omodimerizzazione e di legame all'RNA. Per determinare se questi alleli dominanti negativi di Sam68 possono attenuare o inibire l'eliminazione dell'esone 7 in cellule vive, essi sono stati co-espressi in cellule HEK293 insieme con Sam68 wild-type o con hnRNP A1. È stata co-espressa anche TRA2 $\beta$  per paragonare l'attività delle proteine mutate di Sam68 con quella di un induttore fisiologico dell'inclusione dell'esone 7 di SMN2.

Sorprendentemente, è stato osservato che GFP-Sam68<sub>V229F</sub> e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> sopprimono l'eliminazione dell'esone 7 indotta dall'overespressione di Sam68 o, anche se con minore efficienza, di hnRNP A1. Inoltre, l'effetto di GFP-Sam68V229F è stato anche più forte di quello ottenuto dall'up-regolazione di Tra2 $\beta$ , causando una completa inversione dello splicing alternativo ed un accumulo della forma di intera (indicato anche come full-length) di SMN2 oltre il livello basale anche in presenza di un eccesso di Sam68 o di hnRNP A1. Questi esperimenti suggeriscono che GFP-Sam68<sub>V229F</sub> e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> sono efficienti competitori dell'esclusione dell'esone 7 di SMN2, indicando che inibendo la formazione di un complesso funzionale tra Sam68 (interferendo con la sua capacità di legare l'RNA) e hnRNP A1 (competendo con la sua interazione con la Sam68 endogena) inibisce l'esclusione dell'esone 7 dal pre-mRNA di SMN2.

*GFP-Sam68<sub>V229F</sub> e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> ripristinano l'inclusione dell'esone 7 e permettono l'accumulo della proteina SMN in cellule SMA* – Per determinare se GFP-Sam68<sub>V229F</sub> e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> possono avere effetto sullo splicing alterna-

tivo di SMN2 in condizioni fisiologiche, fibroblasti ottenuti da pazienti affetti da SMA sono stati infettati con costrutti retrovirali codificanti questi mutanti di GFP-Sam68 o GFP come controllo. Le cellule infettate sono state isolate attraverso cell sorter utilizzando il segnale fluorescente della GFP e sono state estratte le proteine e l'RNA dalle cellule isolate. L'espressione di GFP-Sam68<sub>V229F</sub> e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> aumenta l'inclusione dell'esone 7 nel pre-mRNA endogeno di SMN2 nelle cellule dei pazienti rispetto alle cellule infettate con la sola GFP (Fig. 5A). Questo effetto sullo splicing alternativo risulta in un aumento nella produzione della proteina SMN (Fig. 5B). Va sottolineato che la quantità di proteina SMN prodotta dopo espressione di GFP-Sam68<sub>V229F</sub> e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> è paragonabile a quella osservata in fibroblasti di controllo provenienti da un donatore asintomatico (GM03814). Inoltre, l'espressione di GFP-Sam68<sub>V229F</sub> (Fig. 5C) e GFP-Sam68<sub>351-443</sub> (dati non mostrati) potrebbero anche essere in grado di ripristinare una proteina SMN funzionale, come dimostrato dalla formazione delle gemme nei nuclei come nei fibroblasti di controllo. Questi esperimenti dimostrano che la distruzione di un complesso funzionale tra Sam68 e hnRNP A1 mediante l'overespressione di proteine mutanti dominanti negativi di Sam68 ripristina l'attività di SMN in cellule SMA.

È evidente per un esperto nella tecnica che possono essere apportate modifiche ai metodi e alle procedure senza allontanarsi dall'ambito dell'invenzione come esposto nelle rivendicazioni allegate.

Vantaggiosamente, l'invenzione intende includere mutanti dominanti negativi di Sam68 nella forma di peptidi cellula-permeabili per interferire con l'omodimerizzazione o con il legame di hnRNP A1.

Per permettere la penetrazione della cellula, i peptidi sono modificati all'N-terminale come riportato in Morris et al. 2008, in particolare fondendo 11 residui di arginina seguiti da tre glicine. I peptidi avranno una lunghezza di 10 aminoacidi che comprenderà parte o tutta la regione dall'aminoacido 163 all'aminoacido 171, dall'aminoacido 198 all'aminoacido 227, o dall'aminoacido 351 all'aminoacido 443.

## SPERIMENTALE

*Costrutti plasmidici* – I minigeni pCI-SMN2 e pCI-SMN1 wild-type (Lorson CL et al. 1999) e i minigeni pCDNA3-SMN2 wild-type e mutanti (Kashima, Manley 2003) sono stati descritti precedentemente. pCDNA3-Tra2 $\beta$  è stato fornito da James L Manley (Columbia University, NY).

I plasmidi codificanti GFP-Sam68, GFP-Sam68V229F, GFP-hnRNP A1 e Flag-ASF/SF2 sono stati precedentemente descritti (Paronetto et al. 2007).

Sam68<sub>351-443</sub> è stato amplificato mediante PCR usando la polimerasi Pfu (Stratagene) e pEGFP-C1-Sam68 come template. Il cDNA amplificato è stato subclonato nei siti EcoRI e SalI di pEGFP-C1 (Clontech).

*Culture cellulari e trasfezioni* – HEK293 (acquistate dalla ATCC) e le linee umane di cellule SMA GM03814, GM03813, GM00232 (acquistate dalla Coriell Repositories) sono state mantenute in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM; Gibco BRL) supplementato con siero bovino fetale 10%

(FBS) (BioWhittaker Cambrex Bioscience), penicillina e streptomycin. Per le trasfezioni, le cellule HEK293 sono state seminate in piastre da 35mm un giorno prima e trasfettate con 1 µg di DNA (minigene di pCI-SMN2, pEGF-PSam68wt, pEGFPSam68<sub>V229F</sub>, pEGFP Sam68<sub>351-443</sub>, pEGFP-Sam68 NLSKO, pEGFP<sub>hnRNP A1</sub>, Flag-ASF/SF2, pCDNA3-Tra2β, minigeni di pCDNA3-SMN2 wild type o mutati, pEGFP-C1), utilizzando la Lipofectamine 2000 (Invitrogen) secondo le istruzioni. 24 ore dopo la trasfezione, le cellule sono state coltivate per le analisi biochimiche o dell'RNA (vedi sotto). Per l'RNAi, le cellule a circa il 50/60 % di confluenza sono state trasfettate con piccoli RNA interferenti (siRNAs) (MWG Biotech) usando la Lipofectamine RNAi MAX e il mezzo Opti-MEM (Invitrogen) secondo le istruzioni riportate. Le trasfezioni sono state eseguite per due giorni consecutivi. Le sequenze per i siRNA di Sam68 e hnRNP A1 sono (filamento senso): 5'-GGAUCUGCAUGUCUCAUU-3' (siSam68), 5'-AGCAAGAGAUGGCUAGUGC-3' (sihnRNP A1). La sequenza usata come controllo è: 5'-GUGCUCAAUUGGAUUCUCU-3'.

Estrazione dell'RNA e delle proteine dalle cellule coltivate L'RNA totale è stato estratto dalle cellule HEK293 e dalle linee cellulari umane SMA GM00232, GM03813, GM03814 usando il reagente TRIzol (Invitrogen) a freddo, seguendo le istruzioni riportate dalla casa produttrice. L'RNA ottenuto è stato disciolto in acqua priva di RNAsi (Sigma-Aldrich) e congelato immediatamente a -80°C per ulteriori analisi. Per l'estrazione delle proteine, le cellule HEK293 o i fibroblasti SMA sono stati risospesi nel tampone di lisi (100 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1 mM ditiotreitolo, 10 mM β-glicerofosfato, 0.5 mM NaVO<sub>4</sub>, cocktail di inibitori di proteasi), con aggiunta di 0,5 % Triton-X-100 e gli estratti cellulari dei fibroblasti SMA sono stati anche sonicati. Gli estratti sono stati centrifugati per 10 minuti a 12,000xg a 4°C e i supernatanti sono stati collezionati e usati per gli esperimenti di Western blot.

*Analisi mediante RT-PCR* – L'RNA (1 µg) dalle cellule HEK293 trasfettate e dalle linee umane di cellule SMA è stato usato per RT-PCR usando la trascrittasi inversa M-MLV (Invitrogen) secondo le indicazioni riportate dalla casa. Il 10% della reazione di RT è stata usata come templatato insieme ai seguenti primers: pCI (forward) 5'-GGTGTCCACTCCCAGTTCAA-3', T7 5'-TAATACGACTCACTATAGGG-3', SMN2 Ex6 (forward) 5'-ATAATCCCCCACACCTCC-3' e SMN2 Ex8 (reverse) 5'-GCCTCACCACCGTGCTGG-3'. Sono stati effettuati 25 cicli di amplificazione.

*Analisi mediante Western blot* – Gli estratti cellulari sono stati diluiti in un tampone contenente SDS e bolliti per 5 minuti. Le proteine sono state separate mediante SDS-PAGE su gels al 10% o al 12% e trasferite su membrane Hybond-P (Amersham) come descritto in precedenza (Paronetto et al. 2007). Sono stati utilizzati i seguenti anticorpi (diluizione 1:1000): rabbit anti-Sam68 (Santa Cruz Biotechnology), rabbit anti-GFP (Molecular Probe, Invitrogen), mouse anti-hnRNPA1, mouse anti-tubulin (Sigma-Aldrich), mouse anti-SMN (Beckton and Dickinson). IgGs secondary anti-mouse or anti-rabbit coniugate con la perossidasi di rafano (Amersham) sono stati incubati con le membrane per un'ora a temperatura ambiente alla diluizione di 1:10000 in PBS o TBS

contenenti 0.1% Tween 20. le bande immunomarcate sono state rilevate mediante il metodo chemiluminescente (Santa Cruz Biotechnology).

*Analisi mediante immunofluorescenza* – Linee cellulari umane SMA GM03814, GM00232 and GM03813 cresciute su un vetrino copri-oggetto sono state lavate in PBS e fissate con una soluzione contenente 50% metanolo e 50% acetone per 10 minuti a -20°C. Le cellule sono state lavate a temperatura ambiente con PBS contenente 3% BSA e 0,1% Triton-100X per 30 minuti. L'anticorpo primario diretto contro la proteina SMN (Beckton and Dickinson) (diluito 1:150) è stato aggiunto al vetrino per tutta la notte a 4°C. Dopo tre lavaggi in PBS, le cellule sono state incubate per un'ora al buio e a temperatura ambiente con un anticorpo secondario anti-topo (Alexa fluo) (diluito 1:400) e con l'Hoechst 3332 (diluito 1:1000) per marcare i nuclei. I campioni sono stati montati con la soluzione MOWIOL e la fluorescenza è stata osservata con un obiettivo 100X.

*Espressione retrovirale* – Per l'espressione retrovirale, 15 µg dei vettori retrovirali (pCLPCX-GFP o -GFP-Sam68(V229F) o -GFP-Sam68(351-443) sono stati cotrasfettati con 5µg con un vettore di espressione della proteina G del virus della stomatite vescicolare gp/bsr nelle linee cellulari SMA GM00232 o GM03813 usando il metodo calcio-fosfato. 48 ore dopo, il supernatante contenente le particelle retrovirali è stato raccolto e addizionato con il polibrene (4 µg/mL). Le cellule GM00232 o GM03813 (5×10<sup>5</sup>) sono state infettate mediante incubazione con i retrovirus. Brevemente, l'infezione è stata condotta in tre passi: 1) le cellule sono state incubate con i retrovirus per 4 ore; 2) il supernatante è stato rimosso e l'infezione è stata ripetuta con i virus freschi per altre 4 ore; 3) il supernatante è stato rimosso ed è stata aggiunta una nuova preparazione virale e l'infezione è stata portata avanti per tutta la notte. Alla fine le cellule sono state lavate e 24-48 ore dopo selezionate per l'espressione della GFP mediante cell sorting.

1. Johnson JM, Castle J, Garrett-Engele P, Kan Z, Loerch PM, Armour CD, Santos R, Schadt EE, Stoughton R, Shoemaker DD (2003) *302(5653): 2141-2144*.
2. Black DL (2003) *Annu Rev Biochem 72: 291-336*.
3. Wang ET, Sandberg R, Luo S, Khrebtkova I, Zhang L, Mayr C, Kingsmore SF, Schroth GP, Burge CB (2008) *Nature 456(7221): 470-476*.
4. Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) *Nat Genet 40(12):1413-1415*.
5. Matlin AJ, Clark F, Smith CW (2005) *Nat Rev Mol Cell Biol 6(5): 386-398*.
6. Yu Y, Maroney PA, Denker JA, Zhang XH, Dybkov O, Lührmann R, Jankowsky E, Chasin LA, Nilsen TW (2008) *Cell 135(7): 1224-1236*.
7. Tazi J, Bakkour N, Stamm S (2009) *Biochim Biophys Acta 1792(1): 14-26*.
8. Wang GS, Cooper TA (2007) *Nat Rev Genet 8(10): 749-761*.
9. Krawczak M, Reiss J, Cooper DN (1992) *Hum Genet 90(1-2): 41-54*.
10. López-Bigas N, Audit B, Ouzounis C, Parra G, Guigó R (2005) *FEBS Lett 579(9): 1900-1903*.
11. Monani UR (2005) *Neuron 48(6): 885-896*.
12. Pearn J (1980) *Lancet 1(8174): 919-922*.

13. Zhang Z, Lotti F, Dittmar K, Younis I, Wan L, Kasim M, Dreyfuss G (2008) *Cell* 133(4): 585-600.
14. Kariya S, Park GH, Maeno-Hikichi Y, Leykekhman O, Lutz C, Arkovitz MS, Landmesser LT, Monani UR (2008) *Hum Mol Genet* 17(16): 2552-69. Epub 2008 May 20.
15. Monani UR, Lorson CL, Parsons DW, Prior TW, Androphy EJ, Burghes AH, McPherson JD (1999) *Hum Mol Genet* 8(7): 1177-1183.
16. Lorson CL, Hahnen E, Androphy EJ, Wirth B (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96(11): 6307-6311.
17. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR (2002) *Nat Rev Genet* 3(4): 285-298.
18. Pellizzoni L (2007) *EMBO Rep* 8(4): 340-345.
19. Cartegni L, Krainer AR (2002) *Nat Genet* 30(4): 377-384.
20. Kashima T, Manley JL (2003) *Nat Genet* 34(4): 460-463.
21. Kashima T, Rao N, David CJ, Manley JL (2007) *Hum Mol Genet* 16(24): 3149-3159.
22. Hofmann Y, Lorson CL, Stamm S, Androphy EJ, Wirth B (2000) *Proc Natl Acad Sci USA* 97(17): 9618-9623.
23. Lefebvre S, Burlet P, Liu Q, Bertrand S, Clermont O, Munnich A, Dreyfuss G, Melki J (1997) *Nat Genet* 16(3): 265-269.
24. Singh R, Valcárcel J (2005) *Nat Struct Mol Biol* 12(8): 645-653.
25. Chen HH, Chang JG, Lu RM, Peng TY, Tarn WY (2008) *Mol Cell Biol* 28(22): 6929-6938.
26. Bose JK, Wang IF, Hung L, Tarn WY, Shen CK (2008) *J Biol Chem* 283(43): 28852-28859.
27. Lukong KE, Richard S (2003) *Biochim Biophys Acta* 1653(2): 73-86.
28. Matter N, Herrlich P, König H (2002) *Nature* 420: 691-695.
29. Paronetto MP, Achsel T, Massiello A, Chalfant CE, Sette C (2007) *J Cell Biol* 176: 929-939.
30. Chawla G, Lin CH, Han A, Shiue L, Ares M Jr, Black DL (2009) *Mol Cell Biol* 29(1): 201-213.
31. Li J, Liu Y, Kim BO, He JJ (2002) *J Virol* 76: 8374-8382.
32. Coyle JH, Guzik BW, Bor YC, Jin L, Eisner-Smerage L, Taylor SJ, Rekosh D, Hammarskjöld ML (2003) *Mol Cell Biol* 23: 92-103.
33. Paronetto MP, Zalfa F, Botti F, Geremia R, Bagni C, Sette C (2006) *Mol Biol Cell* 17: 14-24.
34. Grange J, Belly A, Dupas S, Trembleau A, Sadoul R, Goldberg Y (2009) *J Neurosci Res* 87(1): 12-25.
35. Lin Q, Taylor SJ, Shalloway D (1997) *J Biol Chem* 272(43): 27274-27280.
36. Di Fruscio M, Chen T, Richard S (1999) *Proc Natl Acad Sci USA* 96(6): 2710-2715.
37. Kolb SJ, Battle DJ, Dreyfuss G (2007) *J Child Neurol* 22(8): 990-994.
38. Hua Y, Vickers TA, Baker BF, Bennett CF, Krainer AR (2007) *PLoS Biol* 5(4): e73.
39. Hua Y, Vickers TA, Okunola HL, Bennett CF, Krainer AR (2008) *Am J Hum Genet* 82(4): 834-848.
40. Madocsai C, Lim SR, Geib T, Lam BJ, Hertel KJ (2005) *Mol Ther* 12(6): 1013-1022.

41. Baughan T, Shababi M, Coady TH, Dickson AM, Tullis GE, Lorson CL (2006) *Mol Ther* 14(1): 54-62.
42. Marquis J, Meyer K, Angehrn L, Kämpfer SS, Rothen-Rutishauser B, Schümperli D (2007) *Mol Ther* 15(8): 1479-1486.
43. Coady TH, Baughan TD, Shababi M, Passini MA, Lorson CL (2008) *PLoS ONE* 3(10): e3468.
44. DiMatteo D, Callahan S, Kmiec EB (2008) *Exp Cell Res* 314(4): 878-886.
45. Novoyatleva T, Heinrich B, Tang Y, Benderska N, Butchbach ME, Lorson CL, Lorson MA, Ben-Dov C, Fehlbaum P, Bracco L, Burghes AH, Bollen M, Stamm S (2008) *Hum Mol Genet* 17(1): 52-70.
46. Angelozzi C, Borgo F, Tiziano FD, Martella A, Neri G, Brahe C (2008) *J Med Genet* 45(1): 29-31.
47. Kinali M, Mercuri E, Main M, De Biasia F, Karatza A, Higgins R, Banks LM, Manzur AY, Muntoni F (2002) *Neurology* 59(4): 609-610.
48. Pane M, Staccioli S, Messina S, D'Amico A, Pelliccioni M, Mazzone ES, Cuttini M, Alfieri P, Battini R, Main M, Muntoni F, Bertini E, Villanova M, Mercuri E, (2008) *Neuromuscul Disord* 18(7): 536-540.
49. Rajan P, Gaughan L, Dalgliesh C, El-Sherif A, Robson CN, Leung HY, Elliott DJ (2008) *J Pathol* 215(1): 67-77.
50. Paronetto MP, Venables JP, Elliott DJ, Geremia R, Rossi P, Sette C (2003) *Oncogene* 22(54): 8707-8715.
51. Tsai LK, Tsai MS, Ting CH, Wang SH, Li H (2008) *Neurobiol Dis* 31(3): 361-367.
52. Schumacher B, Hanazawa M, Lee MH, Nayak S, Volkmann K, Hofmann ER, Hengartner M, Schedl T, Gartner A (2005) *Cell* 120(3): 357-368.
53. Morris CM, Deshayes S, Heitz F, Divita G (2008) *100(4): 201-217.*

## RIVENDICAZIONI

1. Uso di un mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1 per la produzione di un medicamento per il trattamento della SMA.

2. Uso di un mutante dominante negativo secondo la rivendicazione 1 così che è ripristinata l'espressione della proteina SMN (survival motor neuron protein) nelle cellule di un individuo affetto da SMA.

3. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, caratterizzato dal fatto che detto mutante dominante negativo della SEQ. ID. NO:1 comprende almeno una sostituzione amminoacidica nella regione corrispondente agli amminoacidi 81 a 276.

4. Uso secondo la rivendicazione 3, caratterizzato dal fatto che detta almeno una sostituzione amminoacidica è da valina a fenilalanina in corrispondenza della posizione 229.

5. Uso secondo la rivendicazione 1 o 2, caratterizzato dal fatto che detto mutante dominante negativo della SEQ. ID. NO:1 comprende almeno una sostituzione amminoacidica nella regione corrispondente agli amminoacidi 419 a 443.

6. Uso secondo la rivendicazione 5, caratterizzato dal fatto che detto mutante dominante negativo della SEQ. ID. NO:1 ha una sostituzione

amminoacidica da arginina ad alanina in corrispondenza della posizione 436.

7. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 5 o 6, caratterizzato dal fatto che detto mutante dominante negativo della SEQ. ID. NO:1 ha una sostituzione amminoacidica da arginina ad alanina in corrispondenza della posizione 442.

8. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni 1 o 2, in cui detto mutante dominante negativo è un polipeptide di SEQ ID NO:4.

9. Uso secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 1 a 8, in cui detto mutante dominante negativo della SEQ. ID. NO:1 è codificato da un acido nucleico.

10. Vettore per terapia genica comprendente un acido nucleico codificante per un mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1.

11. Mutante dominante negativo della SEQ. ID. NO:1 per uso nel trattamento della SMA.

12. Metodo per ripristinare l'espressione della proteina SMN nelle cellule di un individuo affetto da atrofia muscolare spinale per il trattamento della SMA comprendente somministrare un polipeptide e/o un acido nucleico mutante dominante negativo di Sam68 a dette cellule.

13. Metodo secondo la rivendicazione 12, in cui detto mutante dominante negativo della SEQ ID NO:1 è un mutante dominante negativo secondo una qualsiasi delle rivendicazioni da 3 a 8.



Fig. 1a

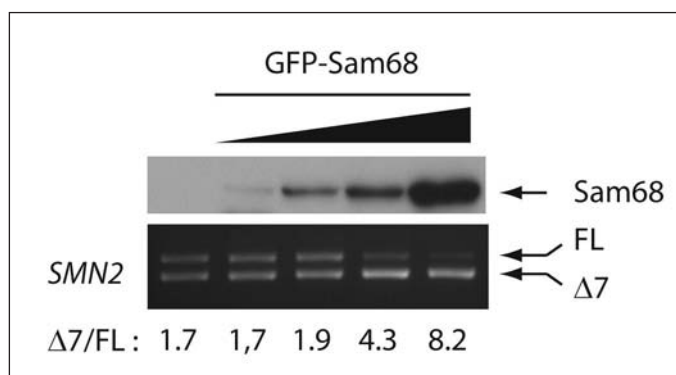


Fig. 1b

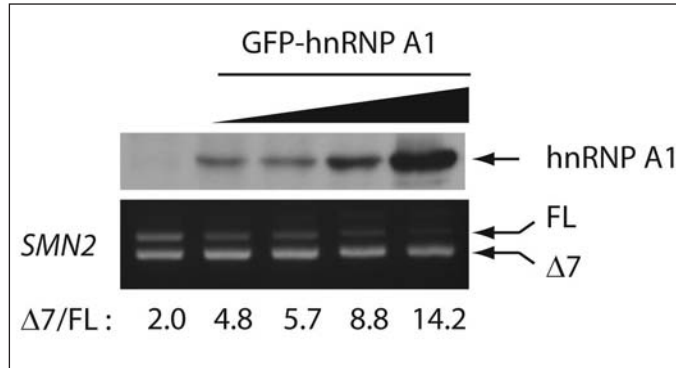


Fig. 1c

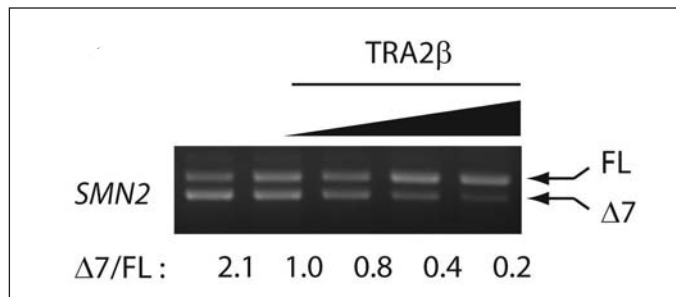


Fig. 1d

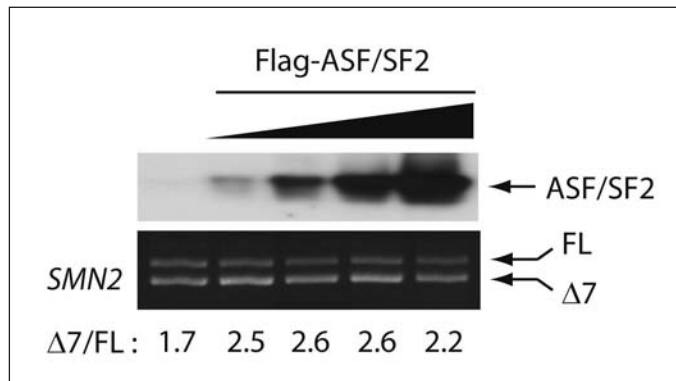


Fig. 1e

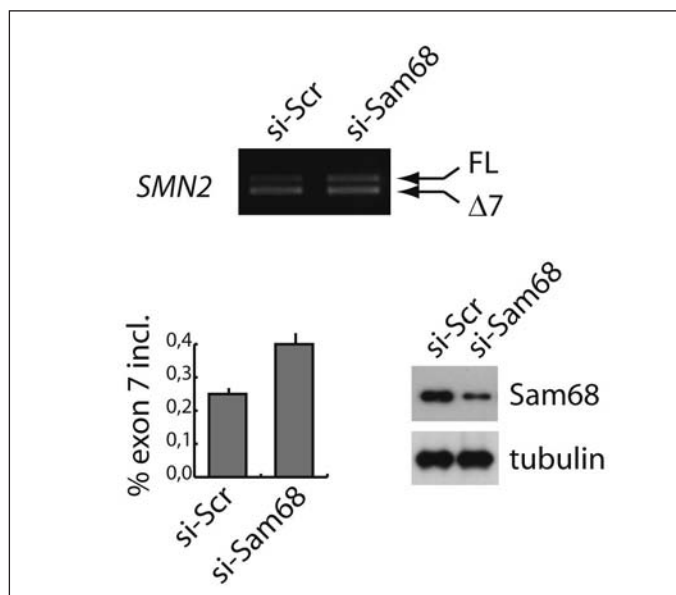


Fig. 1f

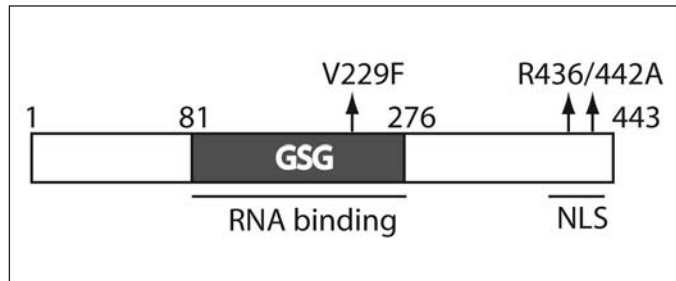


Fig. 2a

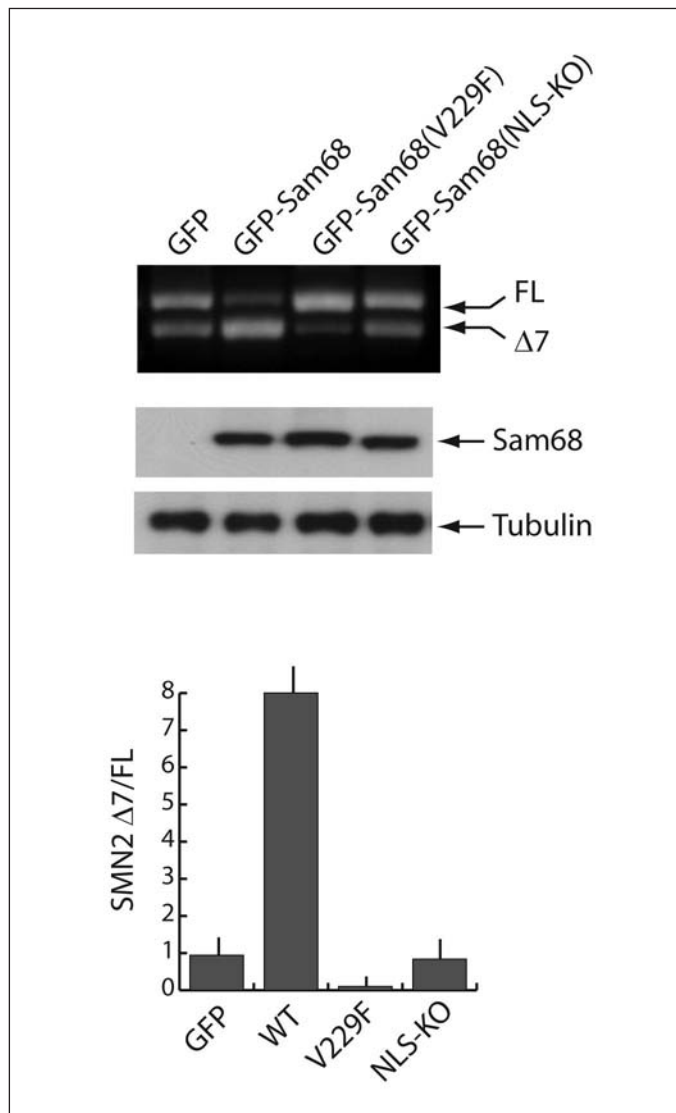


Fig. 2b

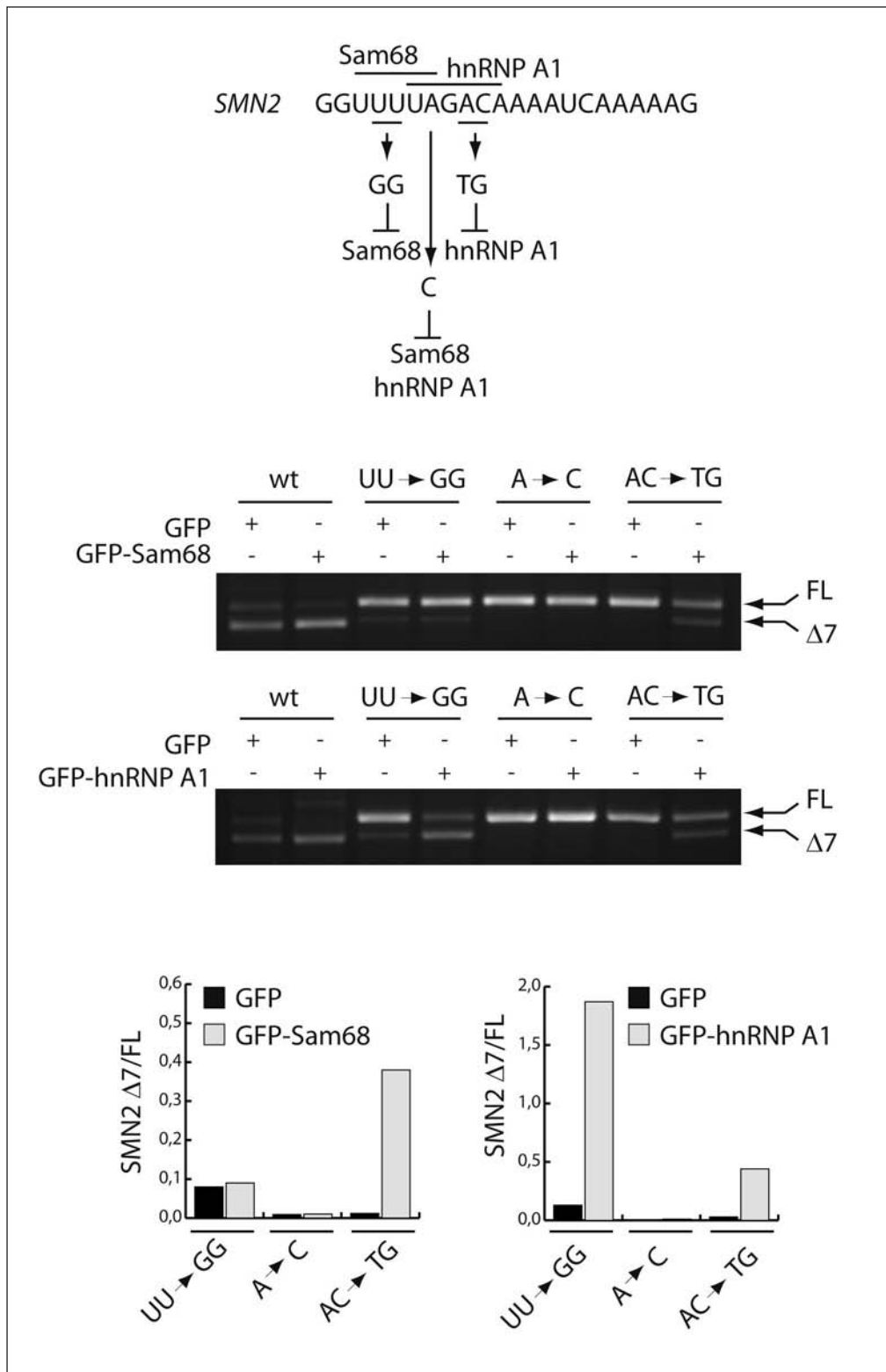


Fig. 2c

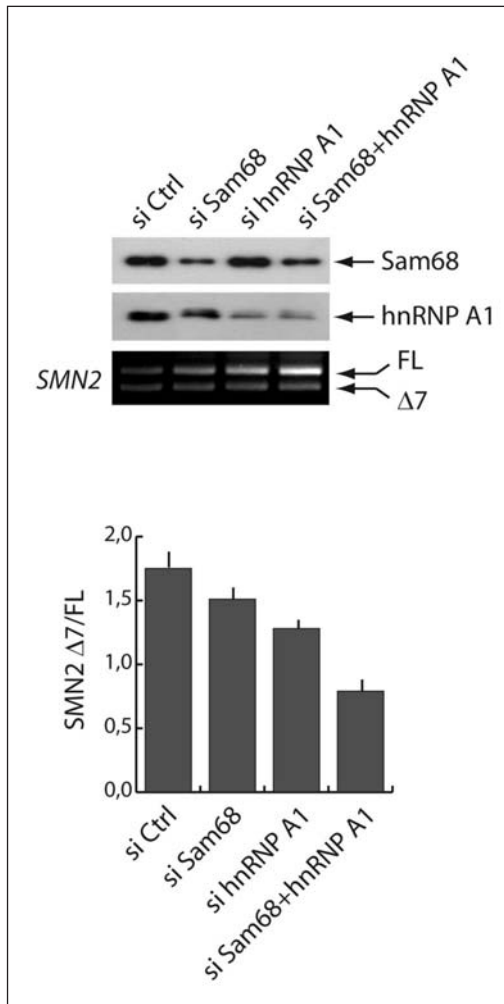


Fig. 3a

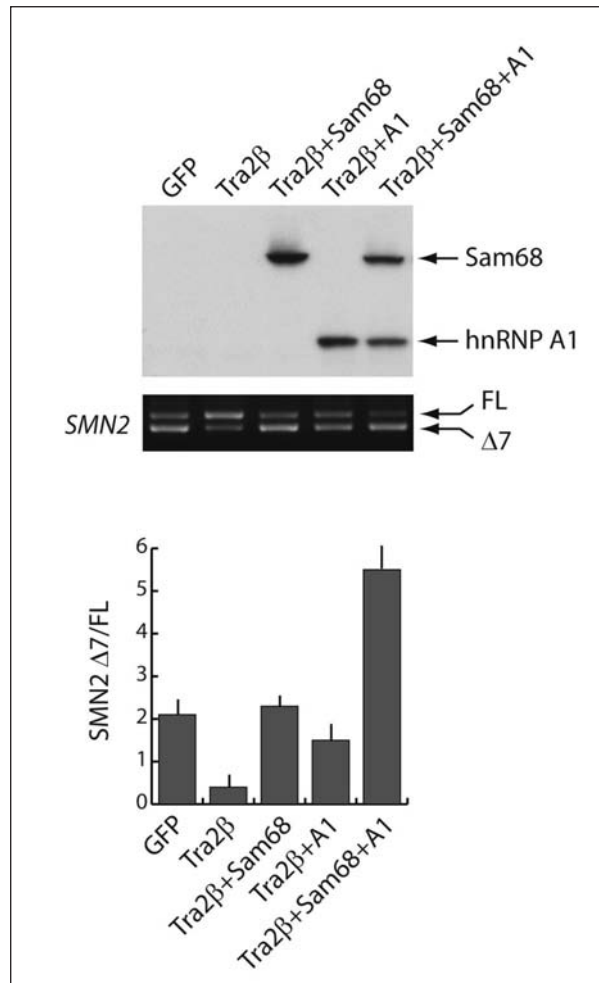


Fig. 3b

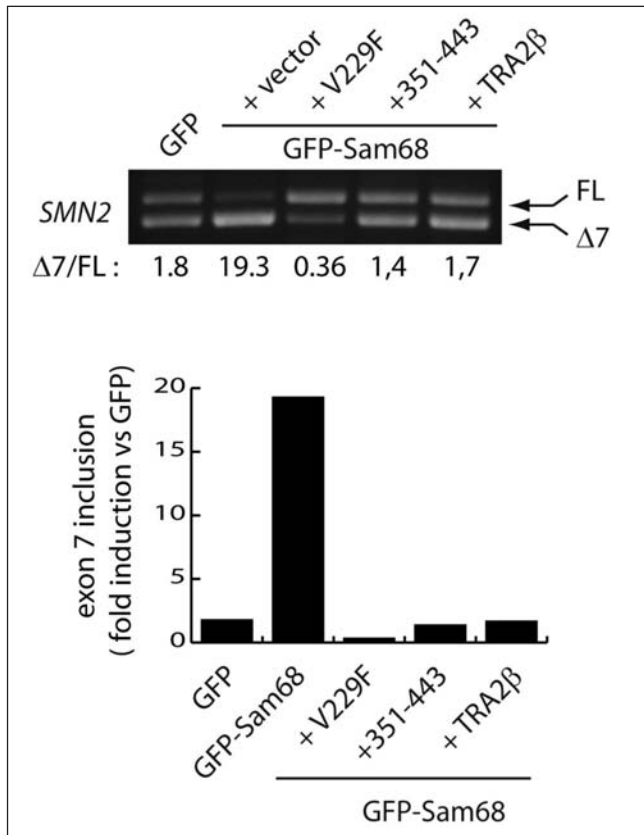


Fig. 4a

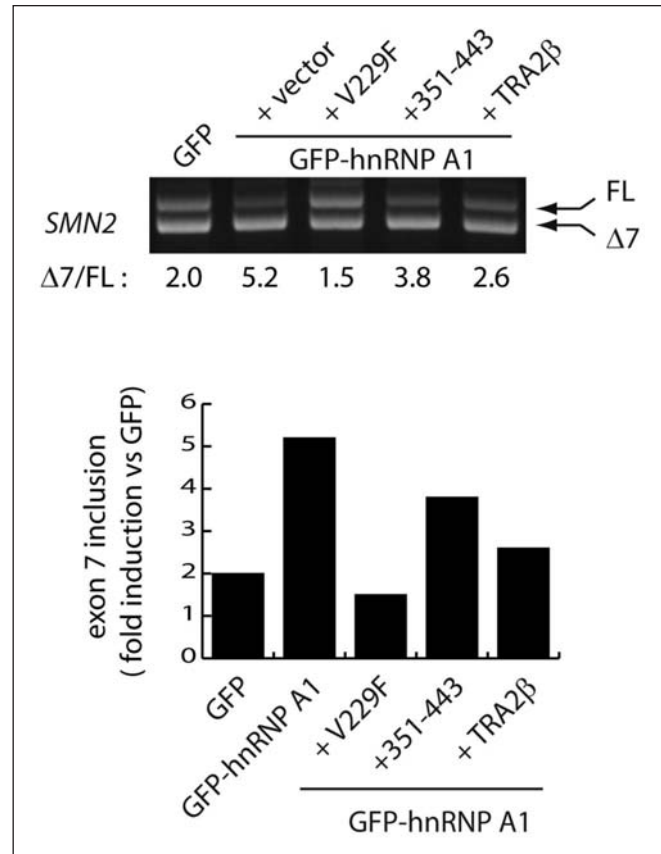


Fig. 4b

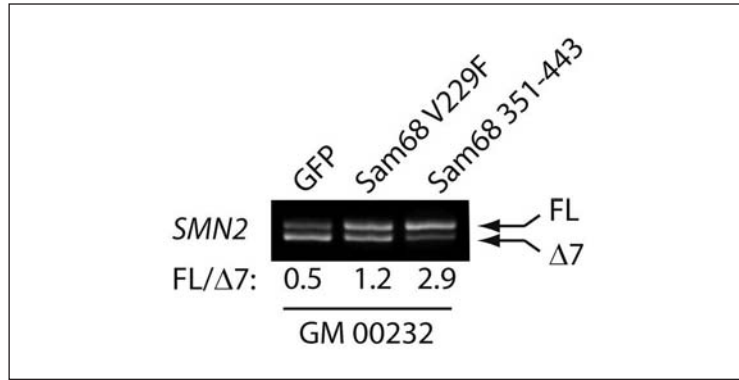


Fig. 5a

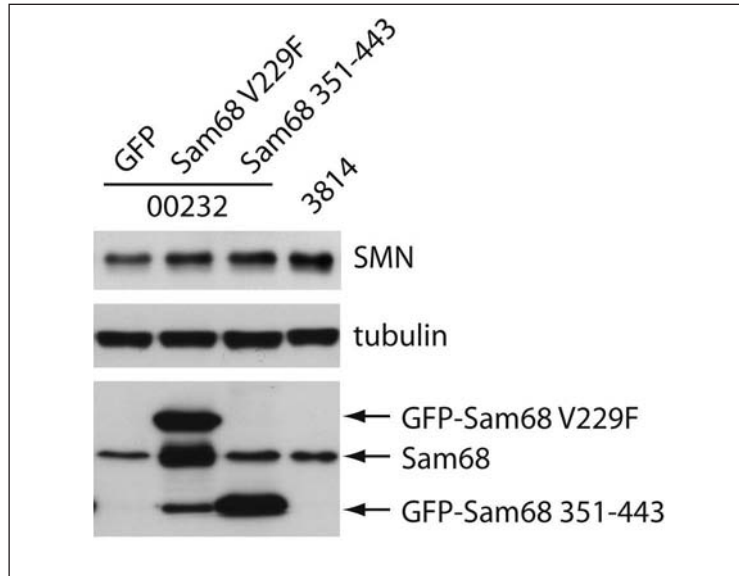


Fig. 5b

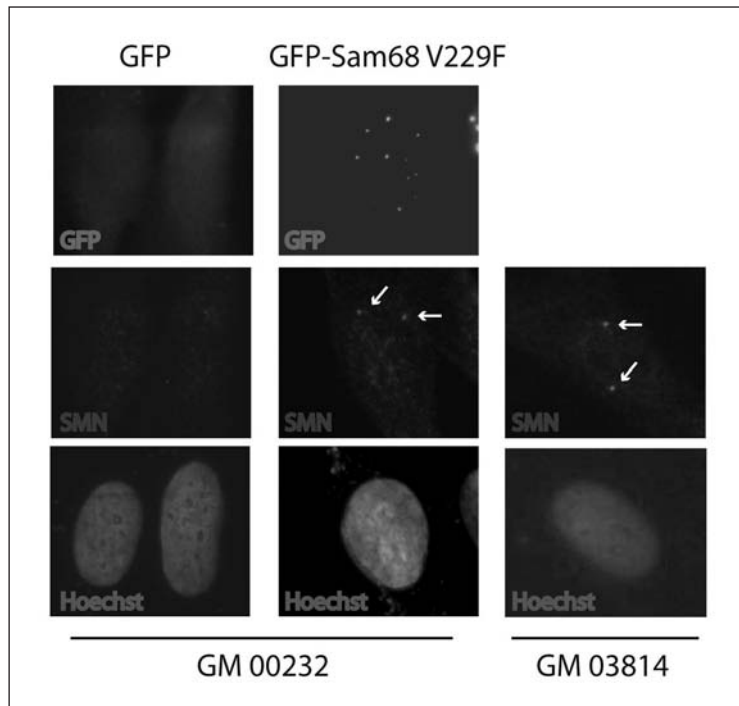


Fig. 5c