



Fundació
La Marató de TV3

20^è SIMPOSIUM
Enfermedades neurodegenerativas



TERAPIA GÉNICA DIRIGIDA A NEUREGULINAS PARA EL TRATAMIENTO DE LA ESCLEROSIS LATERAL AMIOTRÓFICA

Xavier Navarro Acebes

Facultat de Medicina UAB

1. Resumen del proyecto

Objetivos

En este proyecto, pretendemos promover la supervivencia de las motoneuronas y el mantenimiento de la inervación muscular en el ratón SOD1G93A, modelo de esclerosis lateral amiotrófica (ELA), utilizando estrategias de terapia génica para sobreexpresar neuregulina 1 (Nrg1), un factor neurotrófico que favorece la regeneración axonal y la sinaptogénesis actuando sobre las motoneuronas, las células de Schwann y las fibras musculares. Establecemos la hipótesis de que un enfoque combinatorio influirá en varios eventos involucrados en la fisiopatología de la ELA para prevenir eficazmente la progresión de los signos clínicos.

Este objetivo general se divide en los siguientes objetivos específicos:

1. Caracterizar la expresión de Nrg1 y sus receptores ErbB en la médula espinal y los músculos de los ratones SOD1G93A.
2. Promover la formación de nuevas uniones neuromusculares mediante la sobreexpresión de Nrg1 tipo I en músculos de ratones SOD1G93A.
3. Promover la supervivencia de motoneuronas y la regeneración axonal por sobreexpresión de Nrg1 tipo III en la médula espinal por inyección intratecal en ratones SOD1G93A.
4. Combinar los dos enfoques anteriores para modular diferentes mecanismos fisiopatológicos y para obtener mejoras sinérgicas en la supervivencia de las motoneuronas y la preservación de uniones neuromusculares en los ratones SOD1G93A.
5. Investigar los mecanismos endógenos que participan en los efectos de la sobreexpresión de neuregulinas en la supervivencia y la sinaptogénesis de las motoneuronas.

Diseño y metodología

- Construcción de vectores virales: se utilizarán virus adenoasociados (AAV) codificando Nrg1-III (AAVrh10-Nrg1-III), que se administrarán por vía intratecal para inducir sobreexpresión en neuronas espinales, y Nrg1-I (AAV1-Nrg1-I), que se inyectará en músculos de las extremidades.
- Administración de los vectores virales: la terapia se realizará con cada uno de estos vectores en grupos de ratones SOD1G93A, modelo transgénico de ELA, y finalmente con ambos combinados. Los ratones se tratan a las 8 semanas de edad (estadio presintomático) y a las 12 semanas de edad (sintomático), y se evalúan seriadamente con pruebas electrofisiológicas y de locomoción hasta las 16 semanas. Se seguirán algunos subgrupos de ratones para el análisis de la supervivencia.
- Evaluación funcional: se efectuarán pruebas electrofisiológicas de conducción nerviosa motora y de potenciales evocados motores para evaluar la función de las motoneuronas espinales y de las vías espinales descendientes. La función locomotora se evaluará mediante el test de rotarod y DigiGait.
- Estudios histológicos: se obtendrán muestras a tiempos seleccionados para analizar la supervivencia de motoneuronas, la reacción glial, el mantenimiento de uniones neuromusculares, así como para investigar vías moleculares implicadas en la señalización de Nrg1.
- Estudios moleculares: se utilizarán técnicas de biología molecular (WB, PCR) para analizar los cambios de expresión de Nrg1 y de los receptores ErbB, así como de vías relacionadas con la neuroprotección.

Plan de trabajo

- Caracterización de las vías de Nrg1/ErbB en ratones SOD1G93A a lo largo de la evolución de la enfermedad.
- Construcción de los vectores virales apropiados.
- Evaluación de la efectividad de los vectores virales para transducir la expresión de Nrg1.
- Tratamiento de ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-I por inyección muscular.
- Tratamiento de ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-III por vía intratecal.

- Terapia combinada en ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-I por inyección muscular y AAV-Nrg1-III por inyección intratecal. Evaluación de resultados.

2. Resultados

1. Caracterización de las vías de Nrg1/ErbB en ratones SOD1G93A a lo largo de la evolución de la enfermedad

Los análisis de la expresión de Nrg1 y de los receptores ErbB en la médula espinal de ratones SOD1G93A han confirmado que los niveles de ARNm de Nrg1-I aumentan con la progresión de la enfermedad, mientras que los de ARNm de Nrg1-III se reducen. Los niveles de proteína Nrg1 se encontraron disminuidos en la médula espinal de ratones SOD1G93A a las 16 semanas de edad, lo que sugiere una relación con la progresión de la enfermedad. Respecto a los receptores ErbB, hemos observado una reducción progresiva de los niveles de ErbB2, ErbB3 y ErbB4 en la médula espinal de los ratones SOD1G93A. Los niveles de fosforilación de los receptores ErbB se han encontrado también disminuidos en ratones SOD1G93A, lo que indica un funcionalismo menor. La expresión de los receptores ErbB4 en los músculos se reduce a lo largo de la enfermedad en los ratones SOD1G93A y también se ha encontrado reducida en muestras de pacientes de ELA, por lo que constituye un posible biomarcador.

También hemos analizado la presencia de fragmentos proteolíticos de ErbB4 (ecto-ErbB4) en líquido cefalorraquídeo (LCR) y plasma, encontrando una disminución del fragmento de 55 kDa en el LCR de pacientes con ELA, y en plasma de los mismos pacientes y de los ratones transgénicos SOD1. Estos hallazgos apuntan a que los fragmentos ecto-ErbB4 pueden ser un parámetro para evaluar las alteraciones de la vía Nrg1-ErbB, así como un potencial biomarcador en la ELA (López-Font *et al.*, 2019).

Adicionalmente, hemos empleado un modelo de cultivo organotípico de médula espinal para caracterizar el efecto de la adición exógena de Nrg1 en la supervivencia de las motoneuronas. Los resultados han demostrado un efecto neuroprotector frente a la muerte de motoneuronas inducida por excitotoxicidad (Mòdol-Caballero *et al.*, *Front Cell Neurosci*, 2018).

2. Diseño y construcción de los vectores virales y evaluación de su efectividad

Durante el proyecto se han diseñado y producido, según las necesidades de los estudios de terapia génica *in vivo*, vectores virales adenoasociados (AAV) que codifican la expresión de Nrg1 tipo I o tipo III en serotipos AAV1-Nrg1-I y AAVrh10-Nrg1-III (dominio extracelular [ECD] y dominio completo [FL]), respectivamente, además de los vectores control (*mock*). También se ha producido un nuevo vector AAV8-hDes-Nrg1-I para dirigir específicamente Nrg1 a los músculos esqueléticos y cardíaco mediante la administración sistémica.

Se evaluó la biodistribución y la efectividad de la infección en las células diana de los diferentes vectores inyectados en ratones. Para comprobar la eficiencia de los AAV8 y AAV9 codificante bajo la expresión de la desmina humana, se inyectaron en ratones WT y SOD1G93A, y se observó, tanto por técnicas de bioluminiscencia como de actividad de luciferasa en extractos, que el promotor de desmina permitía una elevada expresión en los músculos esqueléticos y cardíaco.

3. Tratamiento de ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-I por inyección muscular

Hemos demostrado una preservación selectiva de la inervación del músculo gastrocnemio inyectado con el AAV1-Nrg1-I en ratones SOD1G93A. El efecto focal de la terapia génica quedó demostrado por la falta de efecto en los músculos adyacentes no inyectados. El estudio electrofisiológico mostró que los ratones tratados tenían un número de unidades motoras similar a los no tratados, pero presentaban un aumento significativo en el tamaño de las unidades motoras. Estudios inmunohistoquímicos demostraron un mayor número de placas motoras ocupadas en el músculo gastrocnemio después de la inyección de AAV-Nrg1-I en comparación con ratones no tratados. También se observó un mayor número de perfiles correspondientes a ramificación axonal en los músculos tratados. En un modelo de rizotomía L4, los resultados también revelaron que la sobreexpresión de Nrg1-I mejoraba la recuperación del músculo gastrocnemio parcialmente denervado, por aceleración de la reinervación colateral (Mancuso *et al.*, *Neurobiol Dis*, 2016).

Estos resultados confirman nuestra hipótesis de que Nrg1-I aumentaría el número de uniones neuromusculares mediante la promoción de reinervación axonal colateral. Además, nos indicaron que había que diseñar una vía de administración capaz de transducir la mayor parte de los músculos del animal.

4. Tratamiento de ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-I por inyección sistémica

Por ello, se produjo un AAV para sobreexpresar Nrg1-I bajo el promotor de la desmina humana (hDes), una proteína presente exclusivamente en músculo esquelético y cardíaco, con el fin de dirigir la expresión del gen terapéutico a estos músculos por administración sistémica. Después de varios estudios para optimizar el vector terapéutico, se produjo un lote del vector viral que garantiza la potencia de infección. El estudio con ratones transgénicos SOD1 ha mostrado que esta terapia génica es capaz de preservar significativamente la función neuromuscular de los músculos de la extremidad posterior a las 16 semanas de vida y mejorar la función locomotora global respecto al grupo de ratones con vector control no activo, así como también permite aumentar la supervivencia de las motoneuronas espinales. Este ensayo abre una vía de interés para la traslación clínica, dado que con una única inyección endovenosa permitiría acceder a toda la musculatura.

5. Tratamiento de ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-III por inyección intratecal

Los experimentos iniciales con Nrg1 tipo III-ECD por vía intratecal no demostraron efectos positivos en la función neuromuscular en los ratones SOD1G93A, aunque el número de motoneuronas supervivientes a las 16 semanas de vida resultó significativamente superior en los ratones tratados con el AAV-Nrg1-III-ECD.

Para completar esta tarea, empleamos un nuevo AAV que contiene Nrg1-III-FL, ya que el dominio intracelular podría tener un papel importante en la función de Nrg1-III para la neuroprotección. Los animales inyectados a las 6 semanas se han evaluado en el rango de 8 a 16 semanas de edad con **test** de conducción nerviosa y *rotarod*. Los resultados en ratones hembras han mostrado que la sobreexpresión de Nrg1-III-FL consigue preservar significativamente la función motora y el número de motoneuronas supervivientes, así como reducir la reactividad glial en los ratones SOD1G93A tratados en comparación con los que recibieron AAV-*mock*. Un estudio posterior con un diseño similar en ratones transgénicos machos, sin embargo, no ha dado resultados tan claramente beneficiosos. Quedan por aclarar las posibles razones de las diferencias según sexo a la terapia administrada.

6. Terapia combinada en ratones SOD1G93A con AAV-Nrg1-I por inyección muscular y AAV-Nrg1-III por inyección intratecal

Durante el período final del proyecto se ha abordado el estudio de la terapia génica combinada que habíamos previsto, mediante inyección simultánea de vectores virales AAV-desmina-Nrg1-I por vía endovenosa para transducir Nrg1-I en musculatura esquelética y AAV-Nrg1-III-FL para producir la expresión de Nrg1-III en médula espinal. Los análisis electrofisiológicos indican que no hay un efecto sinérgico con ambos tratamientos simultáneos. La preservación de la función motora que se obtiene con ambos tratamientos por separado es del mismo nivel que con el tratamiento simultáneo en los ratones SOD1G93A. Esta situación es similar a otros tratamientos simultáneos empleados por nuestro grupo (véase Mancuso *et al.*, *Orphanet J Rare Dis*, 2014). Todo indica que la preservación motora en el modelo de ELA llega a un umbral que no es fácil superar con varias terapias simultáneas.

Resumen

De forma resumida, hemos descubierto lo siguiente:

- Hay una disminución de la expresión de Nrg1 en la médula espinal en la ELA y alteraciones de la expresión de sus receptores ErbB4.
- La adición de Nrg1 en cultivo mejora la supervivencia de las motoneuronas espinales frente a un daño excitotóxico.
- El incremento de expresión de Nrg1 tipo I en músculo esquelético promueve la ramificación de los axones motores y el mantenimiento de las conexiones sinápticas, tanto en el modelo de ELA como después de lesiones de raíces espinales.
- Hemos desarrollado un vector AAV que, bajo el promotor desmina, permite la transducción de Nrg1 a un amplio número de músculos esqueléticos, lo que viabiliza la terapia génica sistémica.
- El aumento de expresión de Nrg1 tipo III en la médula espinal consigue preservar las motoneuronas así como sus conexiones sinápticas y reducir la respuesta microglial, y promueve una mejora funcional significativa, más potente en ratones hembras que en machos.

3. Relevancia e implicaciones futuras

Los resultados obtenidos con la inyección intramuscular de un vector AAV para producir la sobreexpresión de Nrg1-I en el músculo tratado han demostrado que la Nrg1-I tiene un papel importante en el proceso de ramificación axonal y reinervación muscular. La sobreexpresión de Nrg1-I en el músculo gastrocnemio de ratones SOD1G93A produce una compensación funcional significativa, mediante la promoción de la reinervación colateral, abriendo así una ventana para el desarrollo de nuevas terapias centradas en la recuperación funcional y no en la preservación para las enfermedades de la neurona motora.

La administración de un AAV que induce la expresión de Nrg1-I con el promotor desmina ha permitido infectar adecuadamente un amplio número de músculos esqueléticos. Con esta estrategia hemos podido producir un efecto beneficioso de forma sistémica, que podría prevenir la evolución de la pérdida de conexiones neuromusculares en la ELA. De todos modos los niveles de expresión de Nrg1 tipo I administrada intravascularmente bajo el promotor de desmina, pese a que abarca un gran número de músculos, son inferiores en comparación con los que se obtienen tras la inyección intramuscular directa bajo el promotor de CMV. Los resultados obtenidos en los ensayos clínicos de terapia génica con pacientes de SMA o DMD mediante administración intravenosa demuestran que los títulos virales necesarios para alcanzar efectos terapéuticos en las motoneuronas deben ser muy superiores a otros tejidos. Mejoras subsiguientes en la eficiencia del vector viral posibilitarán el aumento de estos niveles de expresión de Nrg1 por vía intravascular para alcanzar efectos beneficiosos más amplios sin comprometer la bioseguridad del paciente.

Los resultados obtenidos con AAV-Nrg1 tipo III permiten preservar las motoneuronas así como sus conexiones sinápticas y reducir la respuesta microglial, y también promueven una mejora funcional significativa. Estos resultados corroboran nuestra hipótesis inicial y aportan un nuevo tipo de terapia génica aplicable a las enfermedades de las motoneuronas.

Finalmente, se ha podido abordar el estudio de la terapia génica combinada que habíamos previsto, incluso mejorada, mediante inyección simultánea de vectores virales AAV-desmina-Nrg1-I por vía endovenosa para transducir Nrg1-I en musculatura

esquelética y AAV-Nrg1-III-FL para producir la expresión de Nrg1-III en médula espinal. La preservación de la función motora que se obtiene con ambos tratamientos por separado es parecida a la que se logra con el tratamiento simultáneo en los ratones SOD1G93A. Esta situación es similar a los resultados con otros tratamientos combinados empleados por nuestro grupo. Todo sugiere que la preservación motora en el modelo murino de ELA llega a un umbral que no se puede superar fácilmente aunque se combinen varias terapias.

4. Bibliografía

Publicaciones

- Mancuso R, Martínez-Muriana A, Leiva T, Gregorio D, Ariza L, Morell M, Esteban-Pérez J, García-Redondo A, Calvo AC, Atencia-Cibreiro G, Corfas G, Osta R, Bosch A, Navarro X.

Neuregulin-1 promotes functional improvement by enhancing collateral sprouting in SOD1G93A ALS mice.

Neurobiol Dis 2016, 95:168-178.

- Rubio MA, Herrando-Grabulosa M, Vilches JJ, Navarro X.

Involvement of sensory innervation in the skin of SOD1^{G93A} ALS mice.

J Periph Nerv Syst 2016, 21:88-95.

- González-Fernández C, Mancuso R, del Valle J, Navarro X, Rodríguez FJ.

Wnt signaling alteration in the spinal cord of amyotrophic lateral sclerosis transgenic mice: special focus on frizzled-5 cellular expression pattern.

PLoS One 2016, 11(5): e0155867.

- Mòdol-Caballero G, Santos D, Navarro X, Herrando-Grabulosa M.

Neuregulin 1 reduces motoneuron cell death and promotes neurite growth in an in vitro model of motoneuron degeneration.

Front Cell Neurosci 2018, 11:431.

- López-Font I, Sogorb-Esteve A, Javier-Torrent M, Brinkmalm G, Herrando-Grabulosa M, García-Lareu B; Turon-Sans J, Rojas-García R, Lleó A, Saura CA, Zetterberg H, Blennow K, Bosch A, Navarro X, Sáez-Valero J.
Decreased circulating ErbB4 ectodomain fragments as a read-out of impaired signaling function in amyotrophic lateral sclerosis.
Neurobiol Dis 2019, 124:428-438.
- García-Lareu B, Herrando-Grabulosa M, Francos-Quijorna I, Mòdol-Caballero G, Pagés-Pi G, Chillón M, Navarro X, Bosch A.
Specific expression of GDNF in muscles as gene therapy strategy for ALS.
En preparación.
- Mòdol-Caballero G, García-Lareu B, Bosch A, Herrando-Grabulosa M, Navarro X.
Increased expression of neuregulin 1 Type III improves functional outcome and motoneuron survival in SOD1G93A ALS mice.
En preparación.

Comunicaciones en congresos

- Navarro X.
Targeting non-neuronal cells for the treatment of motor neuron diseases.
III International Congress on Research and Innovation in Neurodegenerative Diseases, CIBERNED, Málaga, 21-23 de septiembre de 2015.
- Herrando-Grabulosa M, Navarro X.
Nous assaigs terapèutics en un model experimental d'ELA.
Jornada de divulgació d'ELA, Societat de Neurologia, ACMCB, Barcelona, 5 de junio de 2015.
- Martínez-Muriana A, Mancuso R, Francos-Quijorna I, Olmos-Alonso A, Osta R, Perry VH, Navarro X, Gomez-Nicola D, López-Vales R.
CSF1R blockade slows the progression of amyotrophic lateral sclerosis by reducing microgliosis and invasion of macrophages into peripheral nerves.
European Network for the Cure of ALS, ENCALS Meeting 2016, Milán, 19-21 de mayo de 2016.

- Herrando-Grabulosa M, Garcia-Lareu B, Mancuso R, Martinez-Muriana A, Mòdol-Caballero G, Bosch A, Navarro X.
Neuregulin and ErbB4 receptor abnormalities in Amyotrophic Lateral Sclerosis.
European Network for the Cure of ALS, ENCALS Meeting 2016, Milán, 19-21 de mayo de 2016.

- García-Lareu B, Herrando-Grabulosa M, Francos-Quijorna I, Mòdol G, Navarro X, Bosch A.
Specific and global transduction of skeletal and heart muscles in wild type and SOD1 transgenic mice.
XIII Jornada Científica del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular. Universitat Autònoma de Barcelona (UAB), Barcelona, 6 de junio de 2016.

- Herrando-Grabulosa M, García-Lareu B, Mancuso R, Martínez-Muriana A, Mòdol-Caballero G, Bosch A, Navarro X.
Abnormalities of the neuregulin and ErbB4 receptor pathway in amyotrophic lateral sclerosis.
1.º Congreso Nacional de Investigación en Esclerosis Lateral Amiotrófica, Sevilla, 20-21 de junio de 2016.

- Mòdol-Caballero G, Herrando-Grabulosa M, Navarro X.
In vitro assay of the neuroprotective role of neuregulin 1 against motoneuron death.
1.º Congreso Nacional de Investigación en Esclerosis Lateral Amiotrófica, Sevilla, 20-21 de juny de 2016.

- Herrando-Grabulosa M, Garcia-Lareu B, Mancuso R, Martinez-Muriana A, Mòdol-Caballero G, Bosch A, Navarro X.
Abnormalities of the neuregulin and ErbB4 receptor pathway in Amyotrophic Lateral Sclerosis.
Program No 312.04/M16. 2016 Neuroscience Meeting Planner. San Diego, CA: Society for Neuroscience, noviembre de 2016.

- Mòdol-Caballero G, Herrando-Grabulosa M, Santos D, Navarro X. Neuregulin 1 reduces motoneuron cell death, neuroinflammation and promotes neurite outgrowth in a peripheral nerve injury in vitro model.

4th International Symposium on Peripheral Nerve Regeneration, Barcelona, 6-8 de julio de 2017.

- Rubio MA, Herrando-Grabulosa M, Vilches JJ, Navarro X.

Small fiber neuropathy characterization in the SO1G93A ALS mouse model.

2017 PNS Annual Meeting, Sitges, 8-12 de julio de 2017.

- Navarro X.

Neuregulin 1 reduces motoneuron cell death, neuroinflammation and promotes neurite outgrowth in an Amyotrophic Lateral Sclerosis in vitro model.

Alzheimer's Global Summit & XI CIBERNED Scientific Forum, Lisboa, 20-22 de septiembre de 2017.

- García-Lareu B, Herrando-Grabulosa M, Francos-Quijorna I, Mòdol G, Navarro X, Bosch A.

Specific expression of GDNF in muscles as gene therapy strategy for ALS.

9th Biennial Congress of the Spanish Society for Gene & Cell Therapy, Mallorca, 14-16 de marzo de 2018.

- Mòdol-Caballero G, Santos D, Navarro X, Herrando-Grabulosa M.

Neuregulin 1 Reduces Motoneuron Cell Death and Promotes Neurite Growth in an in vitro Model of Motoneuron Degeneration.

2018 ENCALS, Oxford, 20-22 de junio de 2018.

- Herrando-Grabulosa M, Mòdol-Caballero G, García-Lareu B, Bosch A, Navarro X.

Neuregulin 1 Type III gene therapy improves SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis.

2018 ENCALS, Oxford, 20-22 de junio de 2018.

- Herrando-Grabulosa M, Mòdol-Caballero G, García-Lareu B, Bosch A, Navarro X.

Neuregulin 1 Type III gene therapy improves SOD1-linked amyotrophic lateral sclerosis.

VI International Congress on Research and Innovation in Neurodegenerative Diseases, CIBERNED, Santiago de Compostela, 19-21 de septiembre de 2018.

- García-Lareu B, Herrando-Grabulosa M, Francos-Quijorna I, Mòdol-Caballero G, Pagés-Pi G, Chillón M, Navarro X, Bosch A.

Specific expression of GDNF in muscles as gene therapy strategy for ALS.

VI International Congress on Research and Innovation in Neurodegenerative Diseases, CIBERNED, Santiago de Compostela, 19-21 de septiembre de 2018.

- Sogorb-Esteve A, Lopez-Font I, Javier-Torrent M, Brinkmalm G, Herrando-Grabulosa M, García Lareu B, Rojas-García R, Lleó A, Saura CA, Zetterberg H, Blennow K, Bosch A, Navarro X, Sáez-Valero J.

Decreased circulating ErbB4 ectodomain fragments in amyotrophic lateral sclerosis.

VI International Congress on Research and Innovation in Neurodegenerative Diseases, CIBERNED, Santiago de Compostela, 19-21 de septiembre de 2018.

- García-Lareu B, Herrando-Grabulosa M, Francos-Quijorna I, Mòdol G, Navarro X, Bosch A.

Specific expression of GDNF in muscles as gene therapy strategy for ALS.

XI Simposi de Neurobiologia. Societat Catalana de Biologia, Barcelona, 12-13 de novembre de 2018.

Trabajos de final de máster

- Guillem Mòdol.

Effect of Neuregulin-1 (NRG1) in amyotrophic lateral sclerosis (ALS) in vitro models.

Directores: Mireia Herrando, Xavier Navarro. Máster de Neurociencias, UAB, 2015.

- Guillermo Alegre.

Effects of Sigma 1 receptor modulators on a cell model of Amyotrophic Lateral Sclerosis.

Directores: Mireia Herrando, Xavier Navarro.

Máster de Neurociencias, UAB, 2016.

Tesis doctorales

- Guillem Mòdol Caballero.

Gene therapy targeting Neuregulin-1 for amyotrophic lateral sclerosis (ALS).

Directores: Mireia Herrando, Xavier Navarro.

Programa de doctorado de Neurociencias, UAB, depósito previsto en abril de 2019.