

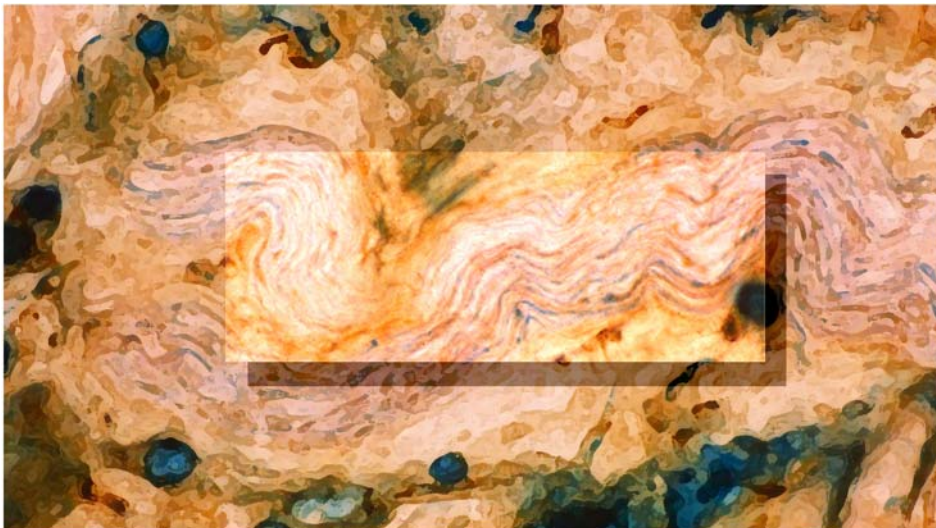


**Universidad de
Zaragoza**



**Facultad de
Veterinaria**

Desarrollo de vectores de terapia génica en enfermedades que afectan al sistema nervioso central: Estudio del fragmento C de la toxina tetánica



**Memoria presentada por
D. Fco. Javier Miana Mena
Para optar al grado de Doctor en Veterinaria
Zaragoza 2002**

El trabajo expuesto en la presente Memoria se ha financiado con fondos de los proyectos de investigación:

“Creación de Proteínas Terapéuticas para el Tratamiento de Enfermedades Neurodegenerativas de la Motoneurona” del **Gobierno de Aragón (P074/2001)**

“Desarrollo de Vectores de Terapia Génica Experimental para el Tratamiento de Enfermedades Neurodegenerativas” del **Fondo de Investigación Sanitaria (F.I.S. 98/0607)**

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero dar las gracias a Charo. Cuando me incorporé al laboratorio, ella acababa de aterrizar de su "post-doc" y traía la famosa TTC bajo el brazo. Supongo que no debió de ser fácil confiar el trabajo que ella había comenzado y al que le había dedicado tanto tiempo, a alguien que no conocía. Muchas gracias, en primer lugar por tu confianza y tu dirección durante estos cuatro años, pero también por tu amistad.

Otra persona a la que quiero dar las gracias es a M^aJesús. Si tuviera que agradecer todo lo que ha hecho por mí, podría llenar otra tesis entera. Sólo diré que siempre ha estado allí en los buenos, y sobretodo en los malos momentos, que es cuando se reconoce a los verdaderos amigos. Muchas gracias.

A Pilar, por haberme permitido formar parte de su equipo. Todavía recuerdo la primera vez que entré en su despacho para pedirle hacer la tesis en el laboratorio.... ya han pasado cuatro años desde entonces. También me gustaría agradecerle la ayuda que me ha prestado y los consejos que me ha dado siempre que se los he pedido.

A D. Isaías, por ser un ejemplo para todos nosotros y por tratar de transmitirnos todas sus inquietudes.

A Clemen, por el interés que ha demostrado por mi trabajo.

A Carmen y Rosa.... Como suele decirse, las mejores esencias se guardan en frasquitos pequeños. Gracias por ser como sois y por haberme tratado tan bien.

A Jorge, por haberme enseñado cuando llegué, y por haberme dado tu amistad después (tranquilo, que no voy a decir lo de "In and out").

A Mamen por echarme una mano en el laboratorio, y por tus interesantes charlas.

A Jesús, por estar siempre dispuesto a ayudarme. Ya verás, vas a hacer una tesis 10.

A Inma, Laura y Eva, por regalarnos siempre una sonrisa.

A mi amiga Gema, para quien la estadística no tiene secretos. Muchas gracias por tu ayuda y por tu paciencia infinita (Ánimo, que pronto te toca a ti!).

A Oscar, una persona realmente interesante. Que no te cambien los ingleses.

A José Ignacio, por su ayuda y el gran interés que pone en hacer bien su trabajo.

A Salvador, por echarme una mano siempre que le ha sido posible.

A Joaquín Soria y Sara Serrano, del Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina, por su ayuda, sus ideas y el gran interés que han demostrado en el desarrollo de este trabajo.

Al Prof. Sarasa por poner a mi disposición todo el material que he necesitado del área de Anatomía y Embriología.

Al Prof. Luis Domínguez, por su ayuda y el gran interés que se tomó por mi trabajo, incluso cuando estaba al otro lado de los Pirineos.

A todo el equipo de la Unidad de Embriología Molecular del Instituto Pasteur de París (y de nuevo a Charo, por haberme permitido vivir la mejor experiencia de mi vida). En primer lugar a Philippe, por haberme permitido formar parte de su equipo. También me gustaría agradecer a Sylvie toda su ayuda y su paciencia. Sin ella no hubiera sido posible realizar todo aquel trabajo. A Valerie, por el gran interés que demostró por mi trabajo, y por tener siempre una pregunta interesante que hacer. Ah! Muchísimas gracias por hacer que encontrase el gusto por la comida china! A ver cuando repetimos. A Hervé, Sandrine, Cecile y Dominique, por su amabilidad y simpatía, y por supuesto por haberme ayudado durante toda mi estancia en París.

Cuando hablo de los parisinos, por supuesto no puedo olvidar a Jean Claude Benichou, una de las personas más interesantes y divertidas de las que me he encontrado. Sólo por haberlo conocido, ya valió la pena ir a París. También quiero agradecer como se portaron conmigo Natalie y Clemire, las locas más divertidas del otro lado de los Pirineos. A Pascal, por toda su ayuda con el confocal, por su interés y por su confianza, pero sobretodo por su amistad. Muchísimas gracias a todos vosotros por haber sido como mi familia en París. A ver cuando nos vamos otra vez todos juntos de tapas por París!

Y todavía quedan los de la residencia.... Al indescriptible Alberto, todo un personaje! Y a todo el clan italiano: A la divertidísima Nadia, por hacernos pasar tan buenos ratos. A Francesco, por su desinteresada e incalculable ayuda. A Nicholeta, por su gran sentido del humor. Y por supuesto a la picolla Maria Anna. Grazie tante!

Al equipo de La Resaca F.C.: A Paco, José Luis, Ramón, Julio, Alberto, Oswaldo y sobretodo a Pepe Nacho, Pepín y Pablo (que fuera del campo no tienen precio), porque a pesar de lo mal que jugais, conseguimos ganar la Liga. A mí me costó un tobillo, un dedo y la espalda, pero valió la pena por el hecho de haber pasado tan buenos momentos con vosotros y por haber conocido unos tíos como vosotros.

A Mariano, Juan y Oscar. Cuando vuelvan a sus países, saben que dejan un amigo en España. Por supuesto, no me olvido de los que ya se fueron: Manuel y Alirio, todavía les echamos de menos.

A Txema, Carlos y Luis, por ser mis verdaderos amigos y por estar siempre allí.

A mis padres, a los que les debo todo y de los que estoy muy orgulloso. Gracias por todo lo que habeis hecho por mí y por todo lo que me habeis dado. Y por supuesto, gracias a toda mi familia: Ñajo (mi ojito derecho), María, Marta, M^aCarmen, Moisés, M^aGloria, Jesús, Mayte y en especial a Pilar, que es la que me tiene que aguantar todos los días y gracias a la cual estos cuatro años se han hecho más cortos.

ÍNDICE

Índice	i
Resumen	vii
1. Introducción	11
1.1. Antecedentes	13
1.2. Objetivos	14
2. Revisión bibliográfica	17
2.1. Enfermedades de la motoneurona	19
2.1.1. Definición	19
2.1.2. Etiopatogenia de las enfermedades de la motoneurona	22
2.1.3. Tratamiento	24
2.2. Terapia génica	28
2.2.1. Estrategias de transferencia de genes	28
2.2.1.1. Vectores virales	28
2.2.1.2. Vectores no virales	33
2.2.2. Terapia génica aplicada a las enfermedades de la motoneurona	35
2.3. Toxina tetánica	39
2.3.1. Mecanismo de acción	39
2.3.1.1. Unión neuroespecífica	39
2.3.1.2. Internalización en las neuronas	44
2.3.1.3. Traslocación al citosol neuronal	45
2.3.1.4. Actividad catalítica	47
2.3.2. Fragmento c de la toxina tetánica	48
2.3.3. Trazadores neuronales: aplicaciones clásicas de la toxina tetánica	51
3. Material y métodos	57
3.1. Construcciones genéticas utilizadas	59
3.2. Obtención de las moléculas	62
3.2.1. Obtención de la proteína	62
3.2.1.1. Purificación	62
3.2.1.2. Visualización y cuantificación	64
3.2.2. Obtención del ADN desnudo	66
3.2.2.1. Purificación	66
3.2.2.2. Visualización y cuantificación	67
3.3. Inyección intramuscular de los moléculas	67
3.3.1. Sistema hipoglosal	68

3.3.2. Placa motora	69
3.3.3. Sistema gastrocnemio-ciático	69
3.3.2.1. Denervación del músculo mediante axotomía	70
3.3.2.2. Denervación mediante tetrodotoxina (ttx)	70
3.3.2.3. Denervación mediante bungarotoxina (btx)	71
3.4. Obtención de los órganos de interés	71
3.4.1. Sacrificio de los animales y fijación	71
3.4.2. Disección de órganos	72
3.5. Procesado de las muestras	72
3.5.1. Análisis "in toto"	72
3.5.2. Análisis histológico	73
3.5.2.1. Microscopía óptica	73
3.5.2.2. Microscopía confocal	74
3.5.3. Análisis ultraestructural	74
3.5.4. Estudio de proteínas totales en el suero	76
3.6. Metodología estadística	76
4. Resultados y discusión	77
Manuscrito 1	83
Manuscrito 2	117
Manuscrito 3	147
Manuscrito 4	185
5. Conclusiones	193
6. Bibliografía	199

RESUMEN

Resumen

En el presente trabajo de investigación se pretenden conocer las posibilidades del fragmento C de la toxina tetánica (TTC) para su utilización como vector de terapia génica en enfermedades que cursan con degeneración de las motoneuronas. Para dicho estudio se ha utilizado la molécula de fusión β -galactosidasa-TTC. Tras demostrar que la molécula es capaz de alcanzar el córtex motor, consideramos que si la proteína era producida de forma continua y en pequeñas dosis la respuesta inmunitaria se vería disminuida. Mediante la inyección intramuscular de ADN desnudo que codificaba para la proteína de fusión se comprobó que la molécula de fusión es capaz de expresarse en el músculo y que, gracias al fragmento C de la toxina tetánica, es capaz de salir del músculo y alcanzar centros nerviosos superiores manteniendo la actividad enzimática que va fusionada a él.

El análisis estadístico de los datos obtenidos en 98 animales demostró que la presencia del fragmento C de la toxina tetánica no interfiere en el grado de expresión. Por otra parte, un análisis de los niveles de γ -globulinas en suero indicó la falta de respuesta inmune contra la molécula de fusión. El estudio del patrón de expresión demostró que la cantidad de ADN administrada sólo influye en la misma a corto y medio plazo. Una vez comprobada la capacidad de salida del TTC, desde las células musculares donde se sintetizaba hasta el sistema nervioso central, se realizó un análisis del transporte de la molécula de fusión tras su inyección intramuscular en forma de proteína. Este estudio mostró que el TTC se localiza siempre asociado a las membranas de distintos orgánulos, y que su transporte se realiza en el interior de pequeñas vesículas dentro del axón. El alto tropismo del TTC por la placa motora, así como su transporte, resultó ser dependiente de la actividad neuronal.

Estos resultados hacen del TTC un candidato válido para el transporte de actividades enzimáticas en el campo de la terapia génica de enfermedades degenerativas de la neurona motora. Desde otra perspectiva la molécula de fusión se presenta como una herramienta para el estudio de las conexiones neuronales.

Summary

The aim of this investigation was to find out the possible uses of the fragment C of the tetanus toxin (TTC) as a gene therapy vector in diseases which lead to the degeneration of the motoneurons. The fusion molecule β -galactosidase-TTC has been used in this study. After demonstrating that the molecule was capable of reaching the motor cortex, we considered that if the protein was produced at a constant rate and in small doses the immune response would be reduced. After an intramuscular naked DNA injection which coded the fusion protein, it was proved that the fusion molecule is capable of expressing itself in the muscle and that, thanks to TTC, it is capable of leaving the muscle and reaching the superior nervous centres while maintaining the enzymatic activity which is fused to it.

The statistical analysis of the data obtained in 98 animals demonstrated that the presence of TTC did not interfere with the expression level. On the other hand, an analysis of γ -globulin levels in serum indicated the lack of immune response against molecule fusion. The study of the expression pattern demonstrated that the quantity of DNA administered only influenced it in the short and mid-term. Once the exit capability of TTC was checked, from the muscle cells where it synthesized itself to the central nervous system, a transport analysis of the molecule fusion was performed after the intramuscular injection in form of protein. This study showed that TTC was always located and associated to the membranes of different organules and that it is transported through small vesicles inside the axon. The high tropism of TTC by the neuromuscular junction, as well as its transport, was dependent on neuronal activity.

These results make TTC a valid candidate to transport enzymatic activity in the field of gene therapy to treat degenerative motoneuron diseases. Considered from another perspective the fusion molecule presents itself as a tool to study neuronal connections.

INTRODUCCIÓN

1. Introducción

1.1. Antecedentes

En la sociedad occidental y en mayor medida en los últimos años, las enfermedades neurodegenerativas presentan una gran relevancia, de las más estudiadas son el Parkinson o el Alzheimer, debido al envejecimiento de la población. Sin embargo dentro de este grupo, existen otra serie de enfermedades que cursan también con degeneración de las motoneuronas, y que debido al pronóstico y la falta de tratamiento suponen un grave problema. Entre las más conocidas se encuentran la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) que presenta una incidencia en la población española de 2/100.000 habitantes y una prevalencia de 1/10.000 (esto significa que unos 40.000 españoles vivos desarrollarán la ELA durante su vida). La atrofia músculo espinal (AME) es otra enfermedad que afecta a la motoneurona y que aparece con una incidencia de 1/60.000 habitantes. A pesar de los numerosos estudios realizados tanto para conocer su causa como su mecanismo (Mitchell, 2000; Brown *et al.*, 2000) por el momento no existen tratamientos clásicos efectivos. Por tanto, no es de extrañar, como posteriormente expondremos, que a nivel experimental sean muy numerosos las investigaciones realizadas para intentar desarrollar un tratamiento para este tipo de enfermedades. Sin embargo, a pesar de todos los esfuerzos, los ensayos clínicos realizados por el momento no tienen resultados satisfactorios, posiblemente debido a la falta de accesibilidad a las motoneuronas y al sistema nervioso central por cualquier tratamiento utilizado.

Los vehículos específicos hacia las motoneuronas no son numerosos pero existen determinadas moléculas, que debido a sus características, consideramos podrían ser ensayados para este fin. La toxina tetánica es una potente neurotoxina producida por *Clostridium tetani* que tiene la capacidad de atravesar las sinapsis y llegar hasta los centros nerviosos superiores. El fragmento C, obtenido mediante digestión con papaína de la toxina nativa, ha mostrado que mantiene las mismas características de transporte sin presentar poder patógeno (Evinger & Erichsen, 1986; Manning *et al.*, 1990). No es por tanto extraño que, desde hace tiempo, se haya propuesto que dicho fragmento podría ser utilizado como un "transportador" de enzimas hacia las motoneuronas del Sistema Nervioso Central (Fishman &

Savitt, 1989; Beaudé *et al.*, 1990). Existen estudios *in vitro* que demuestran que dicho fragmento fusionado con determinadas enzimas (SOD y hexosaminidasa), aumenta la actividad de las mismas una vez introducidas en las células. (Dobrenis *et al.*, 1992; Francis *et al.*, 1995). En el año 1997 se demostró *in vivo* que dicho fragmento fusionado con una enzima e inyectado intramuscularmente en la lengua de los animales, es capaz de llegar hasta el sistema nervioso central guardando la actividad enzimática. La enzima utilizada fue la β -galactosidasa, un enzima marcador (Coen *et al.*, 1997). Estos resultados parecían demostrar que dicho fragmento podría ser utilizado como vector en terapia génica para el tratamiento de enfermedades que cursan con degeneración de las motoneuronas. Sin embargo, a la hora de plantear su utilización existían una serie de incógnitas que resultaban importantes a la hora de utilizarlo. Para intentar tener un mayor conocimiento de las características de este transportador planteamos la realización de la presente Tesis Doctoral con los siguientes objetivos.

1. 2. Objetivos

El objetivo fundamental es la caracterización del fragmento C de la toxina tetánica (TTC) para su posible utilización en la terapia génica de enfermedades que cursan con degeneración en las motoneuronas. La demostración de su capacidad de transportar actividades enzimáticas al sistema nervioso central se realizará mediante la utilización de la enzima β -galactosidasa. Para alcanzar este objetivo general será necesaria la consecución de los siguientes objetivos específicos:

- 1.- Determinar si la fusión TTC- β -galactosidasa alcanza el córtex motor manteniendo la actividad enzimática tras la inyección proteica intramuscular.
- 2.- Demostrar que el fragmento C de la toxina tetánica tras ser producido por células musculares después de la inyección de ADN desnudo, alcanza el sistema nervioso central manteniendo la actividad de la enzima fusionada a él.
- 3.- Conocer la influencia del fragmento C de la toxina tetánica en la expresión del gen tras la inyección intramuscular del ADN desnudo.

- 4.- Estudiar el efecto de los parámetros dosis y tiempo sobre los niveles de expresión de la proteína de fusión β -gal-TTC tras la inyección de ADN desnudo.
- 5.- Medir la respuesta inmunitaria humoral en los animales inyectados con ADN y su posible correlación con la expresión de la proteína en el músculo.
- 6.- Conocer el mecanismo del transporte del fragmento C y su localización dentro de las células.
- 7.- Comprobar la influencia de la actividad neuronal en el transporte del fragmento C.
- 8.- Determinar las posibilidades de la molécula de fusión β -galactosidasa-TTC para ser utilizado como trazador de circuitos neuronales.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2. Revisión bibliográfica

2.1. Enfermedades de la motoneurona

2.1.1. Definición

Las enfermedades de la motoneurona son un grupo heterogéneo de enfermedades, algunas de ellas hereditarias, con afectación exclusiva o predominante de las neuronas motoras de la corteza cerebral y/o de los núcleos motores del troncoencéfalo y/o de las astas anteriores de la médula espinal. Una clasificación de dichas enfermedades puede observarse en el cuadro 1.

De especial interés dentro de este grupo de enfermedades resulta la esclerosis lateral amiotrófica (ELA) por ser la enfermedad de la motoneurona más frecuente y severa, para la que no existe ningún tratamiento realmente efectivo. Es una enfermedad neurodegenerativa progresiva que afecta principalmente a las motoneuronas del córtex, el troncoencéfalo y la médula espinal (Figura 1). La degeneración de estos grupos neuronales se traduce en un debilitamiento progresivo de los músculos voluntarios, sin alteraciones mentales, sensitivas, sensoriales ni esfinterianas. Puede comenzar por un síndrome bulbar (*parálisis bulbar progresiva*), un síndrome de motoneurona superior (*esclerosis lateral primaria*) o un síndrome de motoneurona inferior (*atrofia muscular progresiva*). La esperanza de vida de los afectados es de 3-5 años, aunque un 10% de los pacientes sobrevive más de 10 años. La prevalencia estimada en España es de 3.5 casos por cada 100.000 habitantes que se ve aumentada a nivel mundial donde existen 5 casos por cada 100.000 personas (Brown, 1997). El 90-95% de los casos de ELA son de tipo esporádico y el 5-10% son familiares (presenta una transmisión autosómica dominante, en la mayoría de los casos). Normalmente afecta a personas entre 40 y 70 años, siendo en un principio más frecuente en los hombres (50% superior) para igualarse después de los 60 años.

Otras de las enfermedades a destacar dentro de este grupo de enfermedades son las amiotrofias espinales (AME), enfermedades hereditarias provocadas por una degeneración selectiva de las motoneuronas de las astas ventrales de la médula espinal, caracterizadas por debilidad y atrofia muscular (Figura 1) (Gutiérrez-Rivas, 1999).

I. Esclerosis lateral amiotrófica (ELA)

- Esclerosis lateral amiotrófica esporádica
- Esclerosis lateral amiotrófica familiar
- Variantes geográficas de la esclerosis lateral amiotrófica
- A su vez, la ELA puede comenzar por:
 - Atrofia espinal progresiva
 - Parálisis bulbar progresiva
 - Esclerosis lateral primaria

II. Atrofias musculares espinales (AME)

- Tipo I (enfermedad de Werdnig-Hoffmann)
- Tipo II (forma intermedia)
- Tipo III (enfermedad de Kugelberg- Welander)
- Tipo IV (atrofia muscular espinal del adulto)
- Atrofia muscular bulboespinal crónica (enfermedad de Kennedy)
- Atrofia muscular bulbar (Fazio-Londe)
- Amiotrofia espinal distal
- Atrofia muscular espinal escapuloperoneal
- Atrofia muscular espinal facioescapulohumeral
- Atrofia muscular espinal monomiélica (Hirayama)

III. Secundarias o sintomáticas:

- Infecciosas:
 - poliomielitis
 - síndrome postpolio
 - herpes zóster
 - enfermedad de Creutzfeldt-Jakob.
- Tóxicas: plomo, mercurio, otras
- Metabólicas:
 - deficiencia de hexosaminidasa A
 - tirotoxicosis
 - hiperparatiroidismo.
- Inmunológicas: discrasias sanguíneas (paraproteinemias, linfomas)
- Agentes físicos: postirradiación
- Enfermedades degenerativas:
 - Espinocerebelosas (E. De Friedreich)
 - Atrofia olivopontocerebelosa
 - Enfermedad de Machado-Joseph
 - Síndrome de Shy-Drager

Cuadro 1. Las enfermedades de la motoneurona:

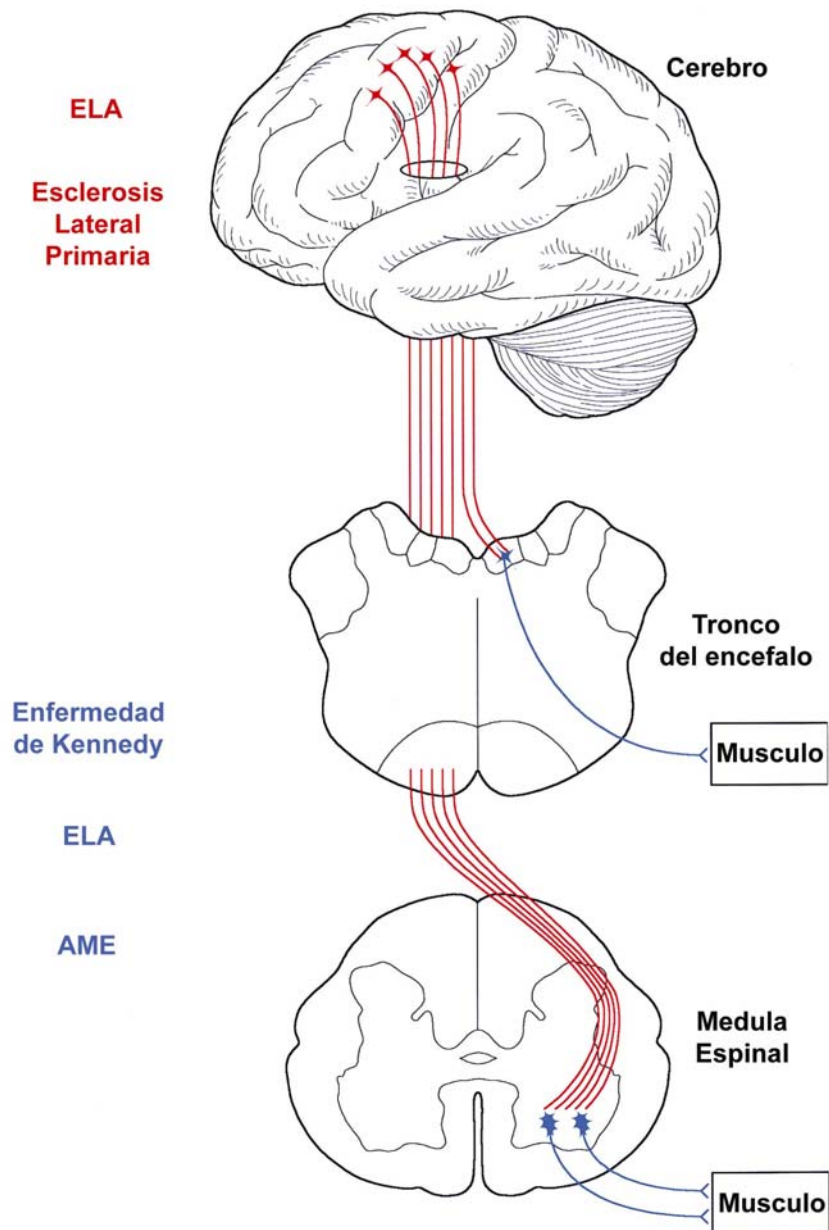


FIGURA 1. La transmisión sináptica se dirige desde la neurona motora superior (en el cerebro) hacia la neurona motora inferior (en el tronco encefálico y médula espinal) para finalmente inervar el músculo. La neurona motora superior (rojo) se origina en la capa V del córtex motor cerebral, y sus axones descienden a través de los tractos corticoespinales para hacer sinapsis con las dendritas de la neurona motora inferior (azul) y entonces inervar los músculos mediante los pares craneales y espinales. Los lugares donde se produce degeneración neuronal en las distintas enfermedades se indica en el diagrama. En la ELA, tanto la neurona superior como la inferior sufren degeneración, mientras que las otras patologías se caracterizan por afectar solamente a la neurona superior o a la inferior (Alisky & Davidson, 2000).

2.1.2. Etiopatogenia de las enfermedades de la motoneurona

La etiopatogenia de las enfermedades de la motoneurona es muy diversa, y a pesar de los numerosos esfuerzos realizados en este campo, en la mayoría de los casos desconocida. En el caso concreto de la ELA se conocen dos tipos bien diferenciados: La ELA de origen genético y la ELA esporádica. Respecto al origen genético de la enfermedad, se ha descrito que un 20% de los pacientes con ELA familiar presentan mutaciones en el gen que codifica la enzima superóxido dismutasa 1 (SOD-1), localizado en el cromosoma 21q 22.1-22.2 (Deng *et al.*, 1993; Rosen *et al.*, 1993). Hasta la fecha se han detectado unas 75 mutaciones diferentes en dicho gen (Gaudette *et al.*, 2000). Sin embargo, se desconoce qué efecto produce dicha mutación en la degeneración de la motoneurona (Bromberg, 1999). Gracias a los modelos animales se ha podido comprobar que la causa de la aparición de la enfermedad es la presencia de la SOD mutada (Gurney *et al.*, 1994). Los casos de ELA familiar ocasionados por mutaciones en SOD1 son denominados ELA1, y el inicio de la misma tiene lugar en la edad adulta. Recientemente se ha descubierto un segundo gen, en una extraña variante de la ELA familiar que se manifiesta antes de los 25 años, llamado ELA2 o juvenil. Este gen se encuentra en el cromosoma 2 y codifica la enzima que ha sido denominada Alsina (Hadano *et al.*, 2001; Shaw, 2001; Yang *et al.*, 2001).

Existen varias hipótesis de los factores que podrían influir en el origen de la ELA esporádica. Se ha observado que los pacientes de ELA tienen unos altos niveles del neurotransmisor glutamato en suero y líquido cefalorraquídeo, por lo que se ha propuesto como una posible causa de la enfermedad. No se conoce cual es el origen del acúmulo de esta sustancia ni como actúa sobre las neuronas, aunque estudios *in vitro* han demostrado que produce degeneración neuronal cuando estas son expuestas durante amplios periodos de tiempo al glutamato (Trotti *et al.*, 1999).

Otros autores han observado un descenso del factor neurotrófico IGF1 en algunos enfermos, sugiriendo que su descenso podría ser otra posible causa. Si bien no se ha demostrado que realmente sea la causa de la enfermedad, existen trabajos que señalan cierta mejoría en los enfermos tratados con IGF-1 (Torres-Alemán *et al.*, 1998).

También se ha barajado la hipótesis de que se trate de un proceso autoinmune, ya que en muchos casos se ha observado un proceso inflamatorio en ciertas porciones de la médula espinal. La presencia de células T, microglía activada e inmunoglobulinas G en lesiones de la médula, podrían ser el inicio del proceso degenerativo del tejido nervioso (Colom *et al.*, 1997).

Por último, un aumento en la formación de radicales libres y del estrés oxidativo (Tu *et al.*, 1997), o la alteración del transporte axónico y/o estructura de los neurofilamentos (Tu *et al.*, 1997) también han sido propuestos como posibles causas de la enfermedad.

Todas estas hipótesis están siendo contrastadas gracias al desarrollo de modelos animales, que ayudan en la investigación de las enfermedades de la motoneurona y en particular de la ELA. Los ratones *knockout* para SOD1 o ratones transgénicos portadores del gen humano mutado del SOD1, que muestran la atrofia muscular progresiva típica con un daño selectivo de las motoneuronas como ocurre en la ELA humana, han sido de gran importancia ya que han servido para comprender mejor la patogenia de la enfermedad (Brown, 1994; Tu *et al.*, 1997). Los trabajos realizados con estos animales han ayudado a comprender que las mutaciones en SOD1 producen un aumento en la cantidad de radicales libres y que la enfermedad en estos animales tiene una correlación con una proliferación de astrocitos y microglía en el cerebro y en la médula espinal, así como un aumento masivo en la degeneración mitocondrial (Kong & Xu, 1998; Borthwick *et al.*, 1999). También se ha podido demostrar que el aumento de glutamato está relacionado en la patogenia de la ELA en humanos (Trotti *et al.*, 1999) a pesar de que por el momento se sigue sin conocer exactamente el mecanismo.

La etiopatogenia de otras enfermedades de la motoneurona está mejor definida. En el caso de las AME se conoce que su origen es la mutación en el gen SMN (*Survival Motor Neuron*), localizado en cromosoma 5q13, del que existen dos copias: una telomérica, denominada SMN1 o SMN^t, y otra centromérica, denominada SMN2 o SMN^c. En la mayoría de las AME, se observan deleciones en el gen SMN1 (exones 3, 6, 7 y 8, afectando principalmente al exon 7). Estas mutaciones originan una alteración de la biogénesis del ARNm, aunque se desconoce exactamente el mecanismo de acción. Así mismo, probablemente la severidad entre las amiotrofias espinales (tipo I muy severa y tipo III leve-moderada) está modulada, por la alteración de otros genes localizados en la misma región 5q13 25 (Lefebvre *et al.*, 1995) así

como por el número de copias del gen *SMN2*. Se ha comprobado que todos los pacientes tienen más de dos copias: 2-3 en la AME tipo I, 3 en la tipo II y 4-8 en la tipo III) (Hahnen *et al.*, 1996). Otros genes que también se considera que poseen influencia sobre el grado de severidad de la enfermedad es el gen *NAIP* (*Neural Apoptosis Inhibitory Protein*), particularmente en el sexo femenino (Novelli *et al.*, 1997), o la ausencia de los genes *C212/H4F5* (Matthijs *et al.*, 1996) o *Btf2-p44n* (*Basal transcription factor*) (Carter *et al.*, 1997).

El origen de la enfermedad de Kennedy (amiotrofia bulboespinal crónica) ha sido también descrito como una expansión de la repetición del triplete CAG del gen que codifica al receptor androgénico en el cromosoma X. Se sabe que este hecho ocasiona una disminución de la capacidad de unión de los andrógenos a los receptores androgénicos, aunque como en los casos anteriores, no su relación con el origen de la degeneración de las motoneuronas. (Gendron & Mackenzie, 1999).

Sin tener en cuenta las causas, estas enfermedades presentan síntomas comunes como debilidad progresiva y atrofia en los músculos de las piernas, para posteriormente generalizarse a brazos, manos y resto de los músculos, desencadenando una muerte por insuficiencia respiratoria. (Brooks, 1994).

2.1.3. Tratamiento

A pesar de que los tratamientos en las enfermedades de la motoneurona son muy numerosos y diversos, los resultados no son muy esperanzadores. Una de las enfermedades en las que más se están ensayando posibles estrategias terapéuticas es la ELA debido a su desenlace fatal y rápido. Actualmente, el tratamiento es principalmente sintomático, y consiste primordialmente en el seguimiento de un programa de ejercicios físicos para retrasar el grado de atrofia muscular. Esta fisioterapia se apoya con la administración de riluzole, un antagonista de la vía del glutamato, que es el único medicamento que ha demostrado cierta eficacia contra la ELA y del que no se conoce su mecanismo de acción. Como resultado se produce un aumento en el tiempo de vida sin necesidad de respiración asistida, aunque no se ha demostrado que aumente la esperanza de vida. (Rowland, 1996; Gurney *et al.*, 1998; Ludolph & Riepe, 1999).

Esta terapia se complementa con dietas ricas en antioxidantes como la vitamina C, vitamina E y ácido alfa-lipoico (Kok, 1997) (Reljanovic *et al.*, 1999), protectores y regeneradores neuronales como la vitamina B12 y ácidos grasos esenciales, y minerales para paliar la deficiencia que se produce (Rowland, 1996). En pacientes con síntomas espásticos, esta medicación se completa con relajantes musculares como el baclofen o el tizanidine (Waragai, 1997; Otero Siliceo *et al.*, 1998).

Ante estos antecedentes no es extraño que en este momento se estén realizando numerosos estudios que intentan desarrollar un tratamiento efectivo contra la enfermedad. Con la ayuda de algunos modelos animales se ha tratado de desarrollar nuevos tratamientos, algunos de los cuales ya han sido ensayados incluso en pacientes. Entre los tratamientos experimentales en desarrollo cabe destacar los antagonistas de los receptores del MNDA, dentro de los cuales, los más utilizados han sido el Memantide y el Dextrometorphano. El primero de ellos se trata de un antagonista de los receptores N-metil-D-aspartato, utilizado en Alemania desde hace 10 años para el tratamiento de demencias, por presentar un potencial efecto terapéutico en numerosas patologías que afectan al sistema nervioso central a pesar de no conocerse su mecanismo de acción. El Dextrometorphano, otro antagonista de los receptores NMDA, también se ha estudiado como posible tratamiento contra la ELA (Askmark *et al.*, 1993). En ambos casos, los estudios preliminares no son muy esperanzadores.

Como anteriormente hemos comentado, otra estrategia que se ha intentado desarrollar es la utilización de los factores de crecimiento. Como ya hemos comentado, existe un descenso de los niveles de IGF-1 en los enfermos de ELA (Eisen & Krieger, 1993; Dore *et al.*, 1996; Torres-Aleman *et al.*, 1998). Diferentes estudios han demostrado que el IGF-1 favorece la supervivencia de las neuronas embrionarias de médula en cultivo, así como la reducción de los niveles de apoptosis que se producen tras la axotomía o la sección medular. En los primeros ensayos en pacientes con ELA se demostró la eficacia de este tratamiento, sobre todo en estadios iniciales y si la progresión de la enfermedad es rápida (Lewis *et al.*, 1993; Ackerman *et al.*, 1999). Un estudio realizado en diferentes centros de EEUU concluía que este tratamiento frena la degeneración neuronal y mejora la calidad de vida del paciente (Lange *et al.*, 1996; Lai *et al.*, 1997). Sin embargo, en la prueba realizada posteriormente en Europa se observó que

este tratamiento no mejoraba de manera significativa la situación del paciente (Borasio *et al.*, 1998).

Otros factores que se han ensayado son el LIF (*Leukemia Inhibitory Factor*) y el CNF (*Ciliary Neurotrophic Factor*). En 1994 se realizaron ensayos clínicos con el CNF en pacientes con ELA u otras enfermedades de la motoneurona (Lindsay, 1994). En 1998 se realizaron ensayos clínicos en pacientes de ELA (Kurek *et al.*, 1998). Ninguno de estos tratamientos resultó efectivo, quizás por la falta de especificidad de estos factores por las motoneuronas.

Más recientemente se han ensayado nuevas moléculas como el PEDF (*Pigment Epithelium-Derived Factor*), comprobando que protege a las células de la medula espinal de rata en cultivo frente al threohydroxyaspartato, un producto químico cuyos efectos se asemejan a los producidos por la ELA (Corse *et al.*, 1999). O la Neurturina, un factor neurotrófico que estimula la regeneración de células nerviosas dañadas. Se cree que los factores neurotróficos como la neurturina o el PEDF protegen a las neuronas de los efectos nocivos del glutamato acumulado, al igual que el riluzole (Bilak *et al.*, 1999). Por último, citaremos el TGF-beta (*Transforming Growth Factor beta*), también utilizado debido a que presenta un papel crucial en la apoptosis neuronal en embriones de pollo (Miller & Ragsdale, 2000).

Otra de las moléculas sintéticas que se han estudiado son el TR500 y Pimozide. El primero es un derivado sintético del glutathione, bloqueante de los canales de calcio voltaje dependientes (Hurko & Walsh, 2000). Un estudio mostró una mejoría en los enfermos de ELA tratados con esta sustancia respecto a otros tratados con tratamientos también experimentales como la vitamina E o el selegine (Szcudlik *et al.*, 1998).

El Deprenyl, un inhibidor de la enzima oxidasa B, parcialmente efectivo en el tratamiento de la enfermedad de Parkinson y Alzheimer, no ha sido efectivo al aplicarse a pacientes de ELA (Kuhn & Muller, 1996; Lange *et al.*, 1998), o la Gabapentina (Miller *et al.*, 2001) y la creatina (Klivenyi *et al.*, 1999). Estos dos últimos producían efectos positivos en los modelos animales, no observándose el mismo efecto tras su paso a pacientes.

Tras estos antecedentes, podemos observar que a pesar de los numerosos estudios realizados, no se han obtenido resultados satisfactorios. Consideramos que los últimos avances en las técnicas de transferencia de genes, junto con la comprensión de algunos de los mecanismos moleculares de la patogenia de la enfermedad, han abierto las puertas a la utilización de la terapia génica como estrategia contra este grupo de enfermedades.

2.2.Terapia génica

Como acabamos de ver, muchos de los tratamientos que se están desarrollando para las enfermedades de la motoneurona se basan en la utilización de moléculas biológicas que deben aportarse como proteínas recombinantes. No hay que olvidar que se tratan de enfermedades crónicas, y por tanto, el aporte de estas sustancias deberá ser constante. Ante estas características, no es extraño que la terapia génica se plantee como una buena estrategia.

La terapia génica es el término que se refiere a la introducción en las células de nuevo material genético con un valor terapéutico. Para alcanzar un determinado efecto biológico con este tipo de terapia es fundamental introducir de manera eficaz la secuencia génica de interés en la célula y conseguir su expresión. Ambos objetivos suponen contar con un adecuado sistema de vehiculización o transferencia, además de disponer de promotores adecuados para conseguir la máxima expresión del gen introducido en la célula (Farreras-Rozman, 1996; García-Foncillas, 1996; Lazo, 1996). Desde las primeras experiencias realizadas en la década de los 90 para tratar el Síndrome de Inmunodeficiencia Severa (Blaese *et al.*, 1995; Bordignon *et al.*, 1995), se planteó que uno de los problemas más importantes con los que se encontraba esta metodología era el desarrollo de estrategias en la transferencia de genes.

2.2.1. Estrategias de transferencia de genes

La introducción en la célula de material genómico extraño a ella se denomina transfección o transferencia génica (Lazo, 1996). Los principales sistemas de transferencia génica incluyen métodos virales o métodos no virales. Cada sistema presenta sus ventajas e inconvenientes, y por tanto, es poco probable que sólo uno de ellos resulte apropiado para el conjunto de indicaciones terapéuticas (Danos, 1999). Realizaremos una pequeña exposición de los vectores más utilizados.

2.2.1.1. Vectores virales

En la transferencia mediada por virus, se sustituyen ciertos genes prescindibles del vector, entre los que se encuentran los que producen el poder patógeno, por aquellos genes que se deseen introducir en las células diana. El tamaño del gen que puede ser insertado, depende del

tipo de virus utilizado y del tamaño de los genes del vector que pueden ser sustituidos (García-Foncillas, 1996).

Como ventaja, destacar que los virus son capaces de infectar una elevada proporción de células sometidas al proceso, es decir, poseen una elevada eficacia de transfección. Sin embargo, pese a esta mayor eficiencia con respecto a los métodos no virales, la mayoría exigen la transfección y expresión de secuencias virales (Gutierrez *et al.*, 1992; Miller, 1992; Mulligan, 1993; Farreras-Rozman, 1996; García-Foncillas, 1996; Kao *et al.*, 1996; Lazo, 1996; Escrig & Aliño, 1997). Este hecho tiene importantes limitaciones, ya que el vector puede lesionar seriamente las células del huésped, provocar la activación de un oncogén, la activación de un virus latente, o la transformación del virus vector en un virus infeccioso, al recombinarse en determinadas secuencias celulares (Farreras-Rozman, 1996; García-Foncillas, 1996; Lazo, 1996).

A continuación pasamos a describir brevemente los vectores virales más utilizados. Los retrovirus, pertenecientes a la familia *Retroviridae*, son bien conocidos y están bien caracterizados. Están constituidos por una cadena de ARN capaz de generar ADN mediante una transcriptasa inversa del virus, en el núcleo de la célula infectada (Varmus, 1988; Dani, 1999; Palu *et al.*, 2000). Los primeros vectores retrovirales que se utilizaron para la transfección génica fueron los derivados de un grupo de retrovirus infectante del ratón, el *Moloney Leukemia Virus* o *MLV* (Kohn *et al.*, 1987). Utilizando técnicas genéticas, se eliminan del virus los genes relacionados con su replicación (*gag*, *pol*, *env*) que son reemplazados por el gen de interés (Lehn, 1993; Salmons & Gunzburg, 1993; Dani, 1999; Danos, 1999). Una vez realizados, estos vectores pueden producirse en líneas celulares estables y su preparación para el uso clínico está, hoy en día, bien establecida. Los sistemas más mejorados permiten obtener altos títulos de vector (10^9 partículas activas/ml) sin contaminación de otros virus (Boris-Lawrie & Temin, 1993; Danos, 1999).

El ADN generado se inserta aleatoriamente en el genoma huésped durante la división celular, de manera estable, pudiendo de esta manera utilizar la maquinaria de expresión de la célula y transmitirse de generación en generación (Varmus, 1988; Dani, 1999). Este virus permite la

inserción de genes de hasta 8Kb aproximadamente y el tiempo de expresión del gen oscila entre 3 y 9 meses (Anderson, 1992; Dani, 1999).

Su utilización se ha limitado esencialmente a la transfección del gen *ex vivo*, en particular de células hematopoyéticas. La aplicación directa *in vivo* es de eficacia reducida pues la célula diana debe estar en división (Dani, 1999). Para resolver este problema se han desarrollado vectores derivados de otra familia retroviral, los *lentivirus*, capaces de transfectar células que no estén en división (Danos, 1999; Buchschacher & Wong-Staal, 2000).

Sus principales desventajas son que no permiten el transporte de genes grandes, y que a pesar de que no se ha descrito nunca, pueden activar oncogenes o inactivar genes supresores de tumores al insertarse en el genoma.

Debido a estas desventajas, se desarrollaron otro tipo de vectores que están siendo actualmente utilizados, los adenovirus. Son virus de doble cadena de ADN de 37kb, encapsulados en una cápside icosaédrica de 70-100nm, capaces de infectar una gran variedad de células, independientemente de la capacidad de división de las mismas. Por tanto, es posible aplicarlo a terapia de tejidos que presenten una escasa división celular (tejido muscular y pulmonar) (Grunhaus & Horwitz, 1992; Curiel, 1999; Dani, 1999; Wickham, 2000). Se multiplican muy fácilmente, lo que permite la producción en el laboratorio de elevados títulos de virus recombinante y, es posible, conseguir una elevada capacidad de transfección de las células diana. Pueden producirse fácilmente concentraciones de 10^{12} - 10^{13} partículas/ml (Robbins & Ghivizzani, 1998; Anderson *et al.*, 2000; Wang & Huang, 2000). Para obtener el vector, se eliminarán varios genes del adenovirus reponsables de la replicación del virus, pero no se modificará la capacidad infectante del mismo. Esto permite la inserción de pequeños segmentos de ADN exógenos de hasta 7 u 8Kb (Danos, 1999; Kochanek, 1999).

Una característica de los adenovirus es que no se integran en el genoma celular, sino que quedan de manera episomal en la mayoría de los casos, lo que por una parte minimiza los riesgos de activación de oncogenes. Sin embargo, este hecho también limita notablemente el tiempo de expresión del gen terapéutico (1 o 2 meses). A esta desaparición también contribuye la eliminación progresiva de células modificadas por acción de los linfocitos T citotóxicos ya

que estos vectores son altamente antigénicos pues el virus sigue expresando genes propios (Scheineider & French, 1993; (Farreras-Rozman, 1996; García-Foncillas, 1996; Kao *et al.*, 1996; Lazo, 1996; Dani, 1999; Danos, 1999; Wickham, 2000). Otro inconveniente es la alta frecuencia de infección por adenovirus en la especie humana, que origina que la población está inmunizada contra ellos, limitando su uso como vector para la terapia génica por el momento (Curiel, 1999; Danos, 1999; Kochanek, 1999; Wickham, 2000).

Los virus adenoasociados son otros vectores virales desarrollados más tarde. Son unos parvovirus no patógenos que contienen una cadena simple de ADN de 4,6Kb (Bueler, 1999; Snyder, 1999; Monahan & Samulski, 2000). Precisan de la existencia de células huésped invadidas por otros virus, normalmente un adenovirus, para poder multiplicarse pero no necesitan la existencia de división celular. En su producción, pueden alcanzarse altas concentraciones 10^{14} partículas/ml (Dani, 1999; Danos, 1999). El mayor inconveniente es que sólo pueden introducir fragmentos de ADN relativamente pequeños (4,5Kb) en comparación con otros vectores (Bantel-Schaal *et al.*, 1999) (Cuadro 2). Como en el caso de los retrovirus es capaz de integrarse en el genoma de la célula diana, lo que hace que su expresión en el hospedador sea muy duradera. Pero a diferencia de ellos, se inserta siempre en un punto muy concreto del brazo corto del cromosoma 19, lo cual disminuye los riesgos de activación de oncogenes. En los extremos de su cadena de ADN posee dos secuencias palindrómicas de 145 bases, denominadas ITR, relacionadas con la incorporación del virus en el genoma. Los virus adenoasociados recombinantes son derivados de plásmidos que contienen las secuencias ITR flanqueando el gen exógeno de interés, además de otros genes estructurales propios del virus (Flotte & Carter, 1995; Bueler, 1999; Dani, 1999; Dupressoir & Schlehofer, 1999). Algunos estudios realizados sobre animales en los que se ha inyectado directamente en el cerebro, han mostrado su alto tropismo por las neuronas, sin ser captado por otras células vecinas (During *et al.*, 1998).

Sus principales ventajas son que no está relacionado con enfermedades humanas, posee un amplio espectro de células hospedadoras y se incorpora en el genoma en un punto muy específico (Bueler, 1999).

Como mayor inconveniente es que su genoma es pequeño, y el tamaño del ADN a insertar queda bastante limitado (Cuadro 2).

Por último, también se han utilizado los *herpes simplex 1*, por el gran neurotropismo que presentan. Su genoma consiste en una larga doble cadena de ADN que no se inserta en el genoma de la célula y que permite la inserción de fragmentos de incluso 35Kb (Glorioso *et al.*, 1995; Latchman, 1999; Umene, 1999). Los vectores recombinantes desarrollados a partir de la cepa nativa han mostrado mantener su expresión durante periodos cortos de tiempo (Lachmann & Efstathiou, 1999; Latchman & Coffin, 2000). Este hecho puede ser debido al inconveniente de que un alto porcentaje de la población presenta anticuerpos frente a ellos, pudiendo llegar a ser ineficaces (Kennedy & Steiner, 1993).

Como conclusión, podríamos decir que el principal problema de los vectores virales, desde el punto de vista terapéutico, es que en su mayoría son muy inmunógenos, provocando una alta respuesta inmune que reduce el grado y tiempo en la expresión del transgen. No obstante, debido a sus numerosas ventajas, se intentan desarrollar diferentes estrategias para bloquear esta respuesta inmune como son la utilización de diferentes serotipos virales en cada administración, el uso de vectores deletéreos en la mayoría de genes antigénicos y la utilización de inmunosupresores. Sin embargo, como ya hemos comentado anteriormente, a pesar de que hasta el momento no se ha descrito, estos virus podrían recombinarse y recuperar su poder patógeno, por lo que resulta interesante el desarrollo de otro tipo de vectores.

	Retrovirus	Adenovirus	AAV
Requiere células en división	SI	NO	NO
Tamaño máximo del inserto	8Kb	8Kb	4.5Kb
Integración en el genoma	SI	NO	A VECES
Oncogénesis potencial	SI	NO	NO?
Duración de la expresión	ESTABLE	TRANSITORIO	ESTABLE?

Cuadro 2. Características de los vectores virales
(<http://140.116.60.1/mdlai/Handout/cancer-gene-therapy/sld014.htm>)

2.2.1.2. Vectores no virales

La principal ventaja de estos vectores es su escaso potencial patógeno e inmunógeno, su facilidad de manejo, producción y purificación, y su capacidad de admitir genes de talla grande. Las construcciones plasmídicas pueden incorporar hasta 2 o 3 veces el tamaño de los vectores virales, permitiendo incorporar todo un gen o construcciones complejas, o incluso codificar más de una proteína (Abdallah *et al.*, 1995). Sin embargo, como inconvenientes presenta la rápida degradación que sufren al inyectarse *in vivo* y su baja eficacia de transfección (Abdallah *et al.*, 1995; Escrig & Aliño, 1997; Kreiss *et al.*, 1999; Li & Huang, 2000).

Una primera estrategia consiste en inyectar el ADN en el tejido sin que ningún mecanismo físico o químico le facilite la entrada, método conocido como inyección de ADN desnudo. El plásmido se mantiene de manera episomal en el núcleo de la célula hospedadora (Maurice, 1995). Se desconoce el mecanismo exacto por el que se produce la transferencia, pero existen indicios de que la entrada del ADN en la célula, o al menos en el músculo, se produce a través de un receptor (Budker *et al.*, 2000; Satkauskas *et al.*, 2001).

Los primeros resultados fueron obtenidos en 1990, por el equipo de *J.A. Wolff* que demostró que inyectando ADN desnudo, es decir, sin envoltura, en músculo estriado de roedor, la expresión en el tejido se mantenía durante meses.

Posteriormente estudios han demostrado la capacidad de captar el ADN desnudo por otros tejidos como el corazón (Li *et al.*, 1997), tiroides (Sikes *et al.*, 1994), piel (Raz *et al.*, 1994) pared del estómago (Takehara *et al.*, 1996), hígado (Hickman *et al.*, 1994), riñón (Dai *et al.*, 2002) o motoneuronas (Sahenk *et al.*, 1993). La inyección directa de ADN plasmídico desnudo se ha observado además en diferentes especies: roedores (Wolff *et al.*, 1990; Danko *et al.*, 1994; Danko *et al.*, 1997; Doh *et al.*, 1997), anfibios (Coen *et al.*, 1999) y primates tras la simple inyección intramuscular del mismo (Zhang *et al.*, 2001).

Las construcciones utilizadas son muy numerosas, pero generalmente se componen de las siguientes partes (Kreiss *et al.*, 1999):

- Un origen de replicación bacteriano, que permite la producción de plásmidos mediante cepas bacterianas.

- Un gen cuya expresión confiere resistencia a un antibiótico, que permitirá el mantenimiento del plásmido en las bacterias bajo presión de selección.

- Un cassette de expresión, que contiene el transgen terapéutico, o el gen que se desee expresar, cuya expresión está controlada por un promotor eucariota, generalmente viral, y por una secuencia de terminación de transcripción. Los promotores más utilizados son el del *virus del simio SV40* o el promotor del *citomegalovirus* caracterizados por un alto nivel de expresión. Alternativamente, la acción del promotor puede ser específica de cierto tejido, como el promotor de las células tumorales (CEA o promotor del antígeno carcinoembrionario, o el de la α -fetoproteína o AFP), el promotor de los hepatocitos (promotor de la fosfoenolpiruvato carboxilasa o PEPCK) o el promotor específico de las células musculares (promotor de la creatina kinasa) (Abdallah *et al.*, 1995).

Una vez que el ADN es captado, la célula no lo expresa de manera uniforme, sino que en primer lugar se produce un pico de expresión durante los primeros días para después descender y mantenerse hasta 19 meses (Wolff *et al.*, 1992; Doh *et al.*, 1997). Entre las causas de este descenso se podrían citar la acción del sistema inmune o la muerte de las células transfectadas (Doh *et al.*, 1997).

Como ventajas de este método, citar la simplicidad en su preparación, el hecho de que insertar grandes fragmentos de ADN (2 a 19Kb), su baja inmunidad y su largo periodo de expresión (hasta 19 meses). La mayor limitación es el bajo número de fibras transfectadas, ya que un alto porcentaje del plásmido inyectado es degradado por endonucleasas y el sistema inmune antes de incorporarse a las células.

Su baja eficacia de transfección esta relacionada con el hecho de que los plásmidos son grandes moléculas de más de 1 μ m de diámetro, cargados negativamente al igual que la membrana celular. Para intentar mejorar la eficacia de entrada se han desarrollado métodos físicos (electroporación) y químicos (asociación a liposomas) (Abdallah *et al.*, 1995). Estos últimos son vesículas generadas artificialmente y constituidas por una o varias envueltas lipídicas que pueden incorporar en su interior diferentes sustancias. Su factor más limitante es

su tamaño, estructura y composición (Kreiss *et al.*, 1999; Zuidam & Barenholz, 1999; Saravolac *et al.*, 2000). El liposoma se funde con la membrana celular liberando el gen al citoplasma. El ADN se introduce en el núcleo sin integrarse en el genoma del huésped, manteniendo la expresión durante varias semanas. A pesar de ser muy poco inmunógenos, son poco eficaces y con una expresión transitoria si se compara con los vectores virales (Kreiss *et al.*, 1999; Zuidam & Barenholz, 1999; Saravolac *et al.*, 2000). Aunque ayudan a que el ADN cruce la membrana, todavía debe liberarse y llegar al núcleo antes de ser degradado por enzimas endosomales (Abdallah *et al.*, 1995).

La electroporación se ha utilizado con mejores resultados *in vivo*. Consiste en introducir en las células el ADN mediante una descarga eléctrica, aumentando la eficacia de transfección (Matthews *et al.*, 1995; Mir *et al.*, 1998; Muramatsu *et al.*, 1998; Mathiesen, 1999; Mir *et al.*, 1999).

2.2.2. Terapia génica aplicada a las enfermedades de la motoneurona

Son pocas las experiencias realizadas en terapia génica directamente en humanos por los problemas éticos que dicha tecnología presenta, aunque existen algunos ensayos que posteriormente describiremos. No ocurre lo mismo en animales transgénicos, modelos de enfermedades de la motoneurona, en los que se han realizado numerosos estudios sobre el papel neuroprotector de ciertas sustancias. El mayor problema con el que se encuentra este tipo de estrategia es hacer llegar estas sustancias hasta el punto donde existe la lesión en el sistema nervioso central, atravesando la barrera hematoencefálica. Algunas experiencias consisten en la inyección directa de estas sustancias en el cerebro o en la médula espinal, presentando dos inconvenientes: es un método muy agresivo y además poco eficaz ya que la inyección se realiza en un punto muy localizado. Otro método sería aprovechar el transporte retrógrado de algunas de estas sustancias o vectores virales, resultando menos invasiva que la inyección intraparenquimal. En principio, se considera que las neuronas corticales podrían ser transfectadas vía retrógrada, pero esta estrategia requeriría inyecciones en la médula espinal (Alisky & Davidson, 2000).

La terapia génica de las enfermedades de la motoneurona se ha investigado utilizando sobretodo ratones transgénicos para la sobre expresión de la enzima SOD1, debido a que la ELA es la enfermedad de la motoneurona más importante y porque es una de las más estudiadas (Alisky & Davidson, 2000).

Una de las experiencias realizadas sobre estos animales, basada en el hecho de que la expresión de calbindina en las neuronas no afectadas en pacientes con ELA está incrementada (Alexianu *et al.*, 1994), fue la transfección de células del hipocampo mediante herpesvirus para producir una sobre expresión de calbindina, comprobándose su efecto neuroprotector (Meier *et al.*, 1997; Meier *et al.*, 1998). También se ha testado como inhibidor de la apoptosis celular el proto-oncogen bcl-2, utilizado para contrarrestar los efectos tóxicos del SOD1 mutado. La sobreexpresión de bcl-2 en ratones mutantes para la SOD-1 produce un retraso en la degeneración neuronal de al menos 45 días (Kostic *et al.*, 1997). En esta línea, más recientemente el equipo de Azzouz utilizó virus adenoasociados para producir la sobreexpresión de bcl-2 en motoneuronas (Azzouz *et al.*, 2000). Sus resultados mostraron un retraso en la degeneración de las motoneuronas en los segmentos de la médula donde se había inyectado el virus, sin embargo, la protección del bcl-2 en solitario no es suficiente para curar la enfermedad. Además, en ratones mutantes modelo de la neuropatía motora progresiva (pmn) que tienen una degeneración masiva y muy rápida de las motoneuronas, se comprobó que la sobreexpresión del bcl-2 mediante transgénesis no tenía ningún efecto neuroprotector (Sagot *et al.*, 1995). No obstante, será necesaria la realización de más estudios para poder desechar esta estrategia.

Otras de las sustancias utilizadas han sido los factores neurotróficos. El equipo de Mohajeri transfectó un cultivo de mioblastos mediante retrovirus recombinantes para el gen del GDNF (*Glial Cell-Derived Neurotrophic Factor*) que fueron implantadas en el músculo gastrocnemio de ratones mutantes para la SOD-1. La funcionalidad del músculo se prolongó durante 20 días respecto a los controles, a pesar de que el grado de degeneración neuronal era similar a la cepa salvaje (Mohajeri *et al.*, 1999).

También son numerosos los ensayos que demuestran que la sobreexpresión de diversos factores neurotróficos (BDNF (*Brain-Derived Neurotrophic Factor*), GDNF e IGF-1) transferidos mediante diferentes vectores, tienen un efecto neuroprotector en distintos modelos animales (Giehl & Tetzlaff, 1996; Gimenez Y Ribotta *et al.*, 1997; Bregman *et al.*, 1998; Hammond *et al.*, 1999). Este hecho, junto al descenso de los niveles de CNTF y NGF en el tejido medular de enfermos de ELA demuestra su posible importancia como herramienta para detener la degeneración neuronal. (Anand *et al.*, 1995; Ono *et al.*, 1999).

A pesar de que todos estos estudios demuestran el efecto neuroprotector de los factores neurotróficos, ensayos clínicos con CNTF, BDNF e IGF-1 en pacientes con ELA esporádica no han mostrado un aumento en la supervivencia de las motoneuronas (Elliott, 1999). Una posible explicación puede ser que los pacientes fueron tratados en una fase terminal de la enfermedad y/o que la administración sistémica de estos factores neurotróficos no alcance niveles terapéuticos en el sistema nervioso central. Existe la posibilidad de que si se lograra hacer llegar estos factores hasta puntos cercanos a la lesión los resultados obtenidos fueran satisfactorios.

Como anteriormente hemos comentado, otra potencial terapia es la utilización de un antagonista del glutamato. Se ha visto que en el 60-70% de los enfermos de ELA existe una pérdida de transportadores de glutamato en la glía debido a defectos en el mRNA, produciéndose así el acúmulo de glutamato extracelular, lo que produce neurotoxicidad (Rothstein *et al.*, 1995). Este hecho también ha sido constatado en los ratones mutantes para SOD-1 (Alexander *et al.*, 2000). Una posible solución sería la reducción de la toxicidad del glutamato mediante la sobreexpresión de sus proteínas transportadoras (Matthews *et al.*, 1997; Dunlop *et al.*, 1999).

El implante de células madre en el sistema nervioso central, tan importante en otras enfermedades, para el tratamiento de enfermedades de la motoneurona no ha dado resultados positivos, posiblemente debido a lo difuso de la lesión producida.

La potencial utilización de vectores virales o no virales para el tratamiento de enfermedades de la motoneurona mediante terapia génica todavía se encuentra en sus primeras etapas, por lo

tanto será necesario continuar investigando en la optimización de estas estrategias. Como hemos visto en el apartado anterior, los vectores no virales (como el ADN desnudo) reúnen una serie de ventajas sobre los vectores virales que podrían ser aprovechadas en una posible terapia génica contra este tipo de enfermedades. Existen experiencias en los que la distrofia muscular ha sido tratada en modelos animales mediante la transfección de las fibras musculares con ADN desnudo (Vilquin *et al.*, 2001). Esta estrategia podría combinarse con la utilización de un vehículo capaz de llevar actividades biológicas desde la periferia al sistema nervioso central, evitando así también los inconvenientes de la administración directa intraparenquimal.

2.3. Toxina tetánica

Las toxinas clostridiales constituyen una familia de poderosas neurotoxinas producidas por la bacteria del género *Clostridium*, y en el caso concreto de la toxina tetánica por la bacteria *Clostridium tetani*. Es una bacteria anaerobia estricta pues carece de las enzimas necesarias para reducir el oxígeno. Se presenta ampliamente en la naturaleza en forma de esporas, que germinan en condiciones apropiadas de bajas concentraciones de oxígeno y presencia de alimentos. Estas condiciones favorables pueden darse en heridas o abrasiones de la piel, donde las esporas llegan a germinar y a producir la toxina. La toxina tetánica es la responsable de la enfermedad del tétanos, un síndrome que se caracteriza por la parálisis espástica de todos los músculos (Montecucco & Schiavo, 1995; Schiavo *et al.*, 2000).

La toxina tetánica es una de las sustancias más tóxicas que se conocen. En el caso del hombre y del ratón su DL50 tiene valores de 0.1 ng/kg (Payling-Wring, 1955; Gill, 1982). Tal grado de toxicidad se debe a su absoluta neuroespecificidad y su actividad catalítica. Sin embargo, siempre existe un periodo de latencia desde que se inyecta la toxina hasta que aparecen los primeros síntomas de tetanización. Este periodo de latencia puede ser de horas o incluso de días dependiendo de la especie, dosis administrada y vía de administración. Por supuesto, el periodo de latencia es mucho mayor cuando la enfermedad está causada por la contaminación de heridas por las esporas de la bacteria, ya que en este caso, también habrá que tener en cuenta el periodo de germinación y proliferación de la misma (Schiavo *et al.*, 2000). En el caso del hombre, este periodo de latencia puede llegar a un mes de duración.

2.3.1. Mecanismo de acción

2.3.1.1. Unión neuroespecífica

Una vez que la toxina tetánica entra en la circulación general, esta se une con gran afinidad a la membrana presináptica de la motoneurona en las terminaciones nerviosas, para posteriormente introducirse en el citosol. Al contrario que la toxina botulínica (producida por *Clostridium botulinum*), la toxina tetánica no actúa a nivel de placa motora (Matsuda *et al.*, 1982) sino que es transportada retrógradamente a través del axón de la motoneurona, en un

movimiento dependiente de microtúbulos, hasta la médula espinal, donde se acumula en las astas ventrales de la sustancia gris (Bruschettini, 1892; Habermann & Dimpfel, 1973; Erdmann *et al.*, 1975; Price *et al.*, 1975; Stockel *et al.*, 1975; Fishman & Carrigan, 1988; Vallee & Bloom, 1991; Halpern & Neale, 1995). La velocidad de transporte estimada para la toxina fue de 7.5 mm/día (Stockel *et al.*, 1975), pero existen ciertas evidencias de que la estimulación neuromuscular aumenta la entrada de la toxina tetánica a la motoneurona (Ponomarev, 1928; Kryzhanovsky, 1958; Hughes & Whaler, 1962; Wellhoner *et al.*, 1973). Una vez en la médula espinal, la toxina migra transinápticamente desde las dendritas de las motoneuronas periféricas a las neuronas inhibitoras asociadas, a través de la hendidura sináptica (Schwab *et al.*, 1979; Schmid *et al.*, 1993), donde bloquea la liberación de los neurotransmisores inhibitorios (Brooks *et al.*, 1955, 1957; Curtis *et al.*, 1976; Benecke *et al.*, 1977; Bergey *et al.*, 1983). Es este bloqueo de las sinapsis inhibitoras por parte de la toxina tetánica el que hace se pierda el control de la contracción voluntaria de los músculos, produciendo la parálisis espástica característica del tetanos (Mellanby & Green, 1981; Wellhoner, 1982; Simpson, 1989; Wellhoner, 1992).

Estructuralmente, la toxina tetánica está compuesta por dos cadenas (Figura 2). Una cadena pesada (H, 100kDa) y una cadena ligera (L, 50kDa) unidas entre sí por un puente disulfuro, cuya integridad es fundamental para la neurotoxicidad de la molécula (Schiavo *et al.*, 1990; De Paiva *et al.*, 1993). La estructura de la toxina revela tres dominios funcionalmente diferentes: La cadena ligera, y los extremos N-terminal y C-terminal de la cadena pesada. Esta organización estructural de la toxina está relacionada con el hecho de que la intoxicación de la neurona se lleve a cabo en cuatro pasos: 1) unión a la membrana, 2) internalización, 3) translocación de la membrana y 4) acción catalítica de la toxina (Montecucco *et al.*, 1994; Montecucco & Schiavo, 1995). Se ha propuesto que la cadena ligera es la responsable de la actividad catalítica intracelular de la toxina (Penner *et al.*, 1986; Poulain *et al.*, 1988; Ahnert-Hilger *et al.*, 1989; Bittner *et al.*, 1989a; Bittner *et al.*, 1989b; Mochida *et al.*, 1989; Weller *et al.*, 1991). El extremo N-terminal de la cadena pesada está implicado en la translocación de la membrana (Hoch *et al.*, 1985; Donovan & Middlebrook, 1986; Blaustein *et al.*, 1987; Shone *et al.*, 1987; Gambale & Montal, 1988; Montal *et al.*, 1992). Por último, el extremo C-terminal de la cadena pesada o fragmento C de la toxina tetánica (TTC) puede subdividirse en dos dominios: El dominio N-

terminal del TTC (TTC_N), muy similar a algunas lectinas que se unen a glicoproteínas, y el extremo C-terminal del TTC (TTC_C) que contiene una secuencia aminoacídica presente en otras proteínas con funciones de reconocimiento y unión a membranas, tales como la interleukina-1 o el factor de crecimiento de fibroblastos. Por otra parte, la delección de todo o gran parte de la porción TTC_N parece no afectar a la unión de la toxina a membranas, no es el caso de la delección de los 10 últimos aminoácidos del extremo TTC_C de la toxina tetánica, ya que desaparece la unión a las neuronas de la médula espinal (Halpern & Loftus, 1993). En 1997 quedó demostrada la gran importancia de los últimos 34 aminoácidos del TTC y en particular la His-1294, para su unión a los oligosacaridos de los polisialogangliosidos (Shapiro *et al.*, 1997). Estos datos concuerdan con el modelo de unión de la toxina tetánica a la membrana presináptica mediante un doble receptor (Montecucco, 1986). Gracias a su dominio TTC_N se uniría a una glicoproteína, y a un polisialogangliosido mediante su porción TTC_C .

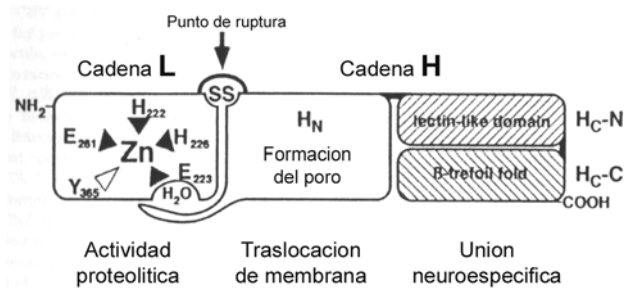


Figura 2. Representación de los tres dominios de la toxina tetánica. Posee tres dominios de tamaño semejante (unos 50KDa). El dominio de la izquierda es una endopeptidasa Zinc dependiente, la cual permanece inactiva mientras el puente disulfuro la une al resto de la molécula. La cadena pesada contiene dos subdominios, responsables de la unión a la membrana neuronal, el transporte y la translocación.

La toxina tetánica difunde por los fluidos corporales desde su lugar de producción o absorción para alcanzar y unirse a la membrana presináptica de las terminaciones colinérgicas. Existen numerosas evidencias de que el TTC juega un papel importantísimo en esta unión neuroespecífica (Bizzini *et al.*, 1977; Helting *et al.*, 1977; Morris *et al.*, 1980; Shone *et al.*, 1985; Weller *et al.*, 1986; Kozaki *et al.*, 1989; Coen *et al.*, 1997; Lalli *et al.*, 1999). Se han realizado numerosos estudios para identificar los receptores de la toxina tetánica, casi siempre a nivel de médula espinal o de cultivos neuronales (Holzer, 1962; Holmgren *et al.*, 1980; Montecucco *et*

al., 1988; Halpern & Loftus, 1993). Estos estudios demuestran que: 1) la toxina tetánica se une a los polisialogangliosidos, particularmente a G_{D1b} , G_{T1b} y G_{Q1b} ; 2) la preincubación con polisialogangliosidos previene parcialmente de la intoxicación por toxina tetánica y de su transporte retroaxonal; 3) la incubación de cultivos celulares con polisialogangliosidos incrementa su sensibilidad a la toxina tetánica; y 4) el tratamiento de las membranas con neuroaminidasa, que elimina los residuos de ácido sialico, disminuye la unión de la toxina. La unión a estos polisialogangliosidos parece ser un mecanismo de unión no saturable de baja afinidad de la toxina tetánica a las membranas del tejido nervioso (Pierce *et al.*, 1986; Yavin & Nathan, 1986; Parton *et al.*, 1988; Schiavo *et al.*, 1991; Figueiredo *et al.*, 1997; Emsley *et al.*, 2000). Estos datos unidos a la relativa baja afinidad de la toxina tetánica hacia los polisialogangliosidos sugiere que estos no son el único receptor de la toxina. Esta hipótesis se corroboró por el hecho de que la unión de la toxina tetánica a la membrana neuronal es sensible a la acción de las proteasas (Lazarovici & Yavin, 1986; Pierce *et al.*, 1986; Yavin & Nathan, 1986), lo que parece indicar la existencia de un componente proteico. Por último, se han realizado estudios sobre líneas neuronales y motoneuronas en cultivo que demuestran que el TTC se unía a estas células interactuando con gran afinidad con una proteína glicosilada de 15kDa que forma parte de la membrana neuronal (Herreros *et al.*, 2000). Dicha proteína ha sido identificada como p15 o Thy-1, una proteína que forma parte de los rafts (Herreros *et al.*, 2001), unos microdominios de la membrana plasmática ricos en esfingolípidos (gangliosidos incluidos), colesterol y ciertas glicoproteínas (Brown & London, 2000; Simons & Toomre, 2000), y que están directamente implicados en el tráfico vesicular a nivel de la membrana (Brown & London, 2000; Simons & Toomre, 2000). Por último, se ha comprobado *in vitro* que el TTC parece interactuar con el receptor $p75^{NTR}$ del NGF, siendo además transportado en las mismas vesículas que dicho factor de crecimiento (Lalli & Schiavo, 2002). Estos estudios, junto con la presencia del subdominio TTC_N con afinidad por ciertas glicoproteínas, indican que la toxina tetánica es capaz de unirse con una alta afinidad y con gran especificidad a la membrana presináptica mediante la interacción con ciertas proteínas (Figura 3). Respecto al papel de los gangliósidos, probablemente sea permitir la adsorción de la toxina a la membrana antes de que se realice una unión más específica a los receptores proteicos con una mayor afinidad (Poulain *et al.*, 1997).

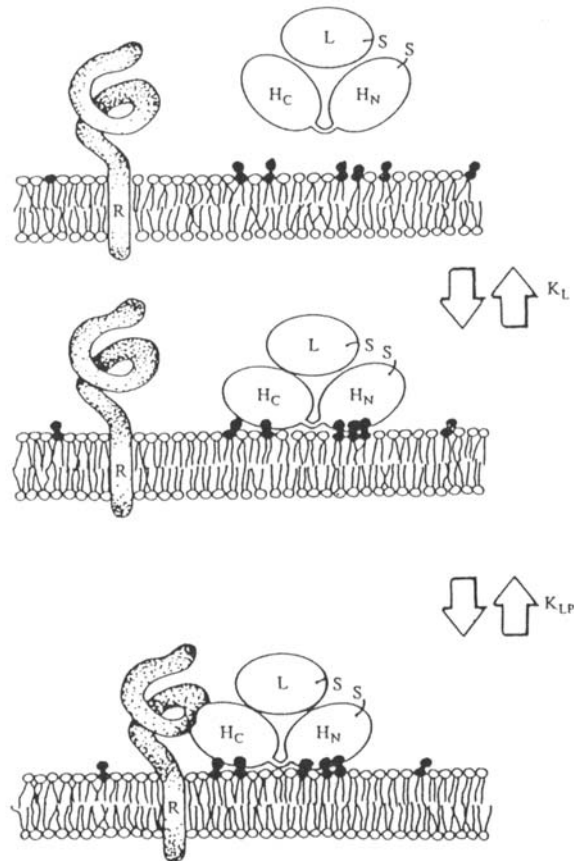


Figura 3. Hipótesis del doble receptor en la membrana presináptica. La neurotoxina se une mediante su cadena pesada a la membrana lipídica gracias a la carga negativa de los lípidos con una afinidad baja. Cuando es adsorbida por la membrana, la toxina puede moverse lateralmente para alcanzar el receptor proteico de alta afinidad.

La identificación de estos receptores es muy relevante porque marcarán la localización y transporte definitivo de las toxinas. A pesar de que tanto la toxina botulínica como la toxina tetánica, ambas pertenecientes a la familia de las neurotoxinas clostridiales, se unen a la membrana presináptica de las motoneuronas, las vías intracelulares son muy diferentes. La toxina botulínica bloquea la neuroexocitosis en las terminaciones periféricas, mientras que la toxina tetánica causa el mismo efecto pero en las sinapsis de la médula, en el sistema nervioso central. Este diferente destino, podría estar determinado en gran medida por los distintos receptores que las condujesen a vías intracelulares diferentes. Por tanto, la identificación de la naturaleza de los receptores periféricos de la toxina tetánica descubriría una puerta de entrada desde la periferia al sistema nervioso central, ayudando al diseño de nuevas rutas para liberar

en el sistema nervioso central distintas sustancias biológicas, incluyendo analgésicos, anestésicos o agentes terapéuticos (Schiavo *et al.*, 2000).

2.3.1.2. Internalización en las neuronas

Debido a que la cadena ligera de la toxina tetánica actúa bloqueando la neuroexocitosis a nivel del citosol, al menos este dominio de la toxina deberá alcanzar dicho compartimento celular. Todas las evidencias indican que la toxina tetánica no entra directamente en el citosol desde la membrana plasmática, sino que es tomada por endocitosis por la célula y dirigida a compartimentos con pH ácido. Distintos estudios mediante microscopía electrónica sobre cultivos celulares han mostrado que la toxina tetánica entra en vesículas tras un proceso termoenergético-dependiente (Dolly *et al.*, 1984; Critchley *et al.*, 1985; Black & Dolly, 1986a, 1986b; Staub *et al.*, 1986; Parton *et al.*, 1987; Matteoli *et al.*, 1996). El TTC parece ser suficiente para el proceso de internalización (Coen *et al.*, 1997; Lalli & Schiavo, 2002). En estudios realizados sobre cultivos de motoneuronas de la médula espinal, la toxina tetánica se encontró en el interior de una gran variedad de vesículas, siendo muy poca la cantidad encontrada en el interior de vesículas sinápticas (Parton *et al.*, 1987). Por el contrario, en el caso de estudios realizados sobre cultivos neuronales de hipocampo, prácticamente la totalidad de la toxina tetánica se encontró en el interior de las vesículas sinápticas cinco minutos después de la despolarización de la membrana (Matteoli *et al.*, 1996). Estos resultados demuestran que a pesar de los esfuerzos realizados, se desconoce en que compartimentos es transportada la toxina tetánica a lo largo de la célula, y mucho menos *in vivo*. Otra de las incógnitas del transporte de la toxina es la influencia de la actividad nerviosa o no sobre dicho transporte. Hace mucho tiempo que se propone mediante pruebas indirectas, que la estimulación nerviosa facilitaría la intoxicación (Ponomarev, 1928; Kryzhanovsky, 1958; Hughes & Whaler, 1962; Wellhoner *et al.*, 1973; Habermann *et al.*, 1980). La neuroexocitosis está estrechamente relacionada con el proceso de reciclaje de vesículas sinápticas vía endocitosis (Schweizer *et al.*, 1995; Sudhof, 1995; Cremona & De Camilli, 1997; Betz & Angleson, 1998), así se considera que la toxina tetánica podría utilizar este tipo de vesículas como *caballo de Troya* para alcanzar las neuronas del sistema nervioso central.

2.3.1.3. Traslocación al citosol neuronal

Independientemente del tipo de vesículas que contienen la neurotoxina que ha penetrado en la célula, la cadena ligera para actuar, debe cruzar la barrera hidrofóbica que supone la membrana de la vesícula para alcanzar el citosol neuronal. Numerosos estudios han demostrado que la toxina tetánica debe exponerse a un pH ácido para producir la intoxicación neuronal (Simpson, 1982, 1983; Adler *et al.*, 1994; Simpson *et al.*, 1994; Williamson & Neale, 1994; Matteoli *et al.*, 1996). Por tanto, el pH juega un papel importantísimo en el hecho de que la cadena ligera pueda pasar del lumen vesicular al citosol. Un pH bajo induce a la toxina a cambiar de una conformación espacial *neutra* a una conformación *ácida* exponiendo porciones hidrofóbicas en su superficie, lo que permite que tanto la cadena pesada como la cadena ligera penetren en el corazón de la bicapa lipídica (Boquet & Duflot, 1982; Boquet *et al.*, 1984; Cabiaux *et al.*, 1985; Shone *et al.*, 1987; Menestrina *et al.*, 1989; Schmid *et al.*, 1993). Tras un descenso del pH, la toxina tetánica forma canales en la membrana de la vesícula mediante la oligomerización del extremo N-terminal de la cadena pesada de la misma (Donovan & Middlebrook, 1986; Shone *et al.*, 1987; Menestrina *et al.*, 1989; Schmid *et al.*, 1993). Aunque existe un consenso general sobre el hecho de que la formación de estos canales esta directamente implicado en la translocación de la membrana, no se ha llegado a un acuerdo sobre el mecanismo utilizado. Existen tres modelos que tratan de explicarlo: modelo tunel, modelo lisis y modelo hendidura (Figuras 4-6), que exponemos a continuación.

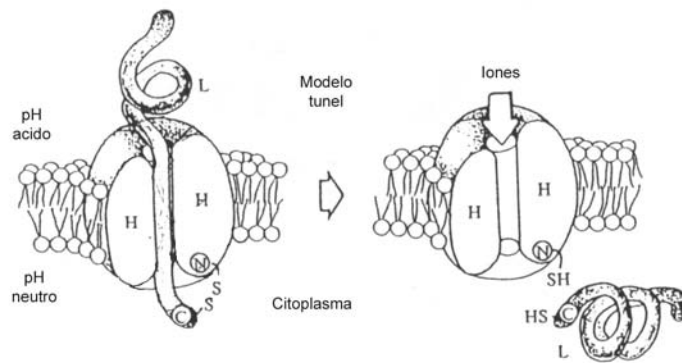


Figura 4. Modelo túnel.

Modelo túnel: Según esta hipótesis la cadena ligera se desdoblaría a un pH bajo y atravesaría un poro formado por la o las cadenas pesadas. Uno de los inconvenientes de este modelo es que el tamaño teórico del poro formado por unas proteínas con tales características de tamaño y carga, no sería suficiente como para permitir el paso de la cadena ligera (Boquet & Duflot, 1982; Hoch *et al.*, 1985).

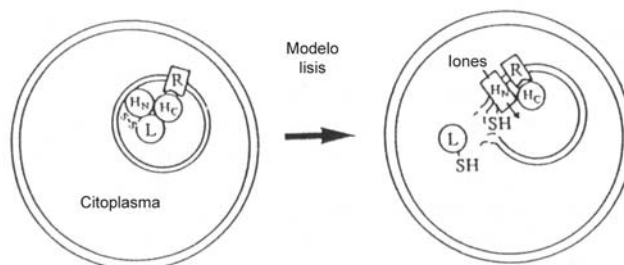


Figura 5. Modelo lisis.

Modelo lisis: El pH de la vesícula descendería por acción de una bomba de protones. Este descenso de pH haría que la toxina formase canales iónicos que alterarían los gradientes electroquímicos. Eventualmente, tal cambio de la permeabilidad produciría una lisis de la vesícula por desequilibrios osmóticos dejando libre a la toxina en el citosol (Cabiaux *et al.*, 1985; Beise *et al.*, 1994). Por el contrario, se ha comprobado que toxinas de naturaleza parecida a la toxina tetánica no producen la lisis celular o de endosomas (Papini *et al.*, 1988;

Sandvig & Olsnes, 1988; Alder *et al.*, 1990; Beaumelle *et al.*, 1992; Beise *et al.*, 1994; Lemichez *et al.*, 1997).

Modelo de hendidura: Es el modelo que mejor explicaría los datos experimentales, proponiendo que la cadena ligera atravesaría la bicapa lipídica a través de algo más parecido a una hendidura formada por las cadenas pesadas en la membrana, en lugar de a través de un poro. En la nueva conformación ácida, las cadenas pesadas formarían una hendidura hidrofílica transmembranaria que permitiría el paso de la cadena ligera, exponiendo su parte hidrofóbica hacia los lípidos de membrana, que quedaría libre en el citosol tras haberse reducido el puente disulfuro (Montecucco *et al.*, 1991, 1994). Una vez en el citosol, y debido al pH neutro, la cadena ligera retomarí su conformación original. Una vez que la cadena ligera hubiera pasado, la hendidura se estrecharía para que las cadenas pesadas expusiesen la menor superficie posible hidrofílica en el corazón de la bicapa lipídica. Por tanto, la hendidura estaría compuesta por dos paredes proteicas rígidas y un ángulo lipídico flexible en un lado (Schiavo *et al.*, 2000).

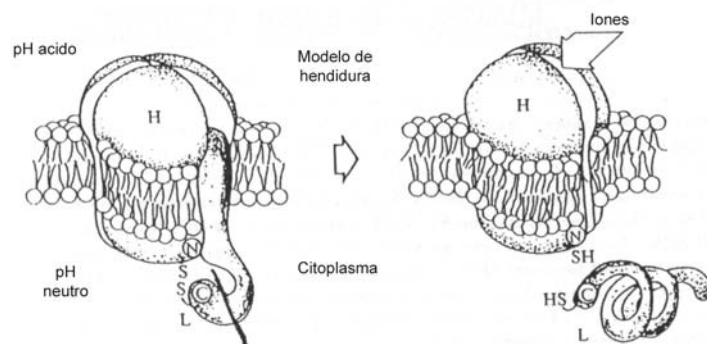


Figura 6. Modelo hendidura.

2.3.1.4. Actividad catalítica

Una vez en el citosol, la cadena catalítica puede unirse a su diana y ejercer su función enzimática. La cadena L ha sido identificada como una metalo proteína Zn-dependiente altamente específica (Schiavo *et al.*, 1992b) que tiene por diana la VAMP/sinaptobrevina, una proteína vesicular de 13Kda (Schiavo *et al.*, 1992a; Yamasaki *et al.*, 1994a; Yamasaki *et al.*,

1994b), o la celubrevina, que es una isoforma de la VAMP/sinaptobrevina (McMahon *et al.*, 1993).

La VAMP y otras dos proteínas de la membrana sináptica, SNAP-25 y la sintaxina, constituyen piezas claves implicadas en la neuroexocitosis. Estas proteínas, además de un grupo de proteínas citosólicas, forman un complejo multiproteico que ha sido propuesto como el que dirige el tráfico vesicular a nivel de la terminación sináptica (Sollner *et al.*, 1993a). La toxina reconoce y corta la VAMP, liberando en el citoplasma la parte de la porción citosólica. El fragmento residual de la VAMP ligado a la membrana es entonces incapaz de permitir la función de la proteína (Figura 7). La ruptura de la VAMP por la toxina conlleva el bloqueo intracelular de la liberación de los neurotransmisores GABA, anulando por tanto la acción inhibitoria sobre la neurona motora (Sollner *et al.*, 1993a; Sollner *et al.*, 1993b; Rothman & Warren, 1994; Hay & Scheller, 1997; Gotte & Von Mollard, 1998).

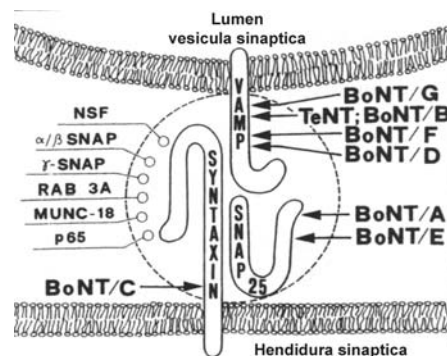


Figura 7. Sitios de acción de las neurotoxinas clostridiales. La toxina tetánica rompe la VAMP, una proteína que poseen las vesículas que contienen el neurotransmisor.

2.3.2. Fragmento C de la toxina tetánica

En los años 70, se realizaron numerosas experiencias para conocer la estructura de las subunidades de la toxina tetánica. El estudio por fragmentación reveló ser una aproximación muy fructífera para la comprensión de la relación estructura-función de la toxina (Price *et al.*, 1975; Helting *et al.*, 1977). En efecto, tal como hemos expuesto anteriormente, estos trabajos

de fraccionamiento, han ayudado a establecer la estructura en tres dominios modulares de la toxina tal y como la conocemos hoy. Entre estos dominios, alguno de ellos como el TTC (Helting *et al.*, 1977) poseen características comunes particularmente interesantes. El análisis del TTC ha mostrado su carácter no tóxico y su capacidad de ligarse con una fuerte afinidad a las membranas neuronales (Bizzini *et al.*, 1977; Helting *et al.*, 1977; Bizzini *et al.*, 1981; Weller *et al.*, 1986; Morris, 2001), probablemente mediante un doble receptor (Pierce *et al.*, 1986; Yavin & Nathan, 1986; Schiavo *et al.*, 1991; Emsley *et al.*, 2000; Figueiredo *et al.*, 2000; Herreros *et al.*, 2000; Herreros *et al.*, 2001). Se deduce que este fragmento contendrá el dominio de ligación de la toxina, o al menos una parte del dominio de ligación suficiente para permitir una interacción con la membrana de las neuronas.

El TTC ha sido clonado por PCR basándose en la secuencia conocida de la toxina tetánica. La proteína sintetizada a partir de este fragmento rC recombinante guarda la capacidad de ligarse a los gangliósidos y a las células neuronales de la misma manera que sí es obtenido por digestión enzimática (Halpern *et al.*, 1990). Gracias al clonaje de este fragmento, ha podido realizarse un estudio preciso de la región necesaria para el ligamiento mediante mutaciones por delección. Así, como se ha descrito previamente, se ha puesto en evidencia que el dominio implicado en la ligación a los gangliósidos concierne principalmente a los 10 últimos aminoácidos de la parte C-terminal del TTC (Halpern & Loftus, 1993).

La característica más interesante del fragmento C es la propiedad de transportarse retrógradamente y pasar a través de las sinapsis, conservando las propiedades de la toxina entera, hecho confirmado por un gran número de estudios (Evinger & Erichsen, 1986; Fishman & Carrigan, 1987; Manning *et al.*, 1990; Cabot *et al.*, 1991; Fishman *et al.*, 1992; Coen *et al.*, 1997). A pesar de que numerosos autores han demostrado su capacidad para atravesar una sinapsis, en ninguno de los estudios realizados se explica exactamente el mecanismo de como tiene lugar el transporte retroaxonal ni dicho paso transináptico.

Las propiedades de transporte retrógrado y transináptico de dicho fragmento, abrirían una nueva vía de investigación dentro del tratamiento de enfermedades neurodegenerativas, por su posible utilización en la conducción específica de moléculas terapéuticas al sistema nervioso central. La primera demostración de tal aplicación fue el estudio realizado por Bizzini en 1980

(Bizzini *et al.*, 1980), pero posteriores estudios han aportado más datos sobre el transporte de enzimas, químicamente ligadas, hacia el Sistema Nervioso Central. Un ejemplo es la glucosa oxidasa, que conjugada al fragmento C puede ser transportada a través del nervio ciático después de ser inyectada en el músculo gastrocnemio (Beaude *et al.*, 1990). También la peroxidasa (HRP), puede ser transportada a la motoneurona del Sistema Nervioso Central tras ser inyectada en la lengua o en la pata de la rata (Fishman & Savitt, 1989). Además, el paso transináptico hacia las terminaciones presinápticas de las neuronas ligadas a las motoneuronas ha sido también demostrado con el conjugado HRP-fragmento C (Fishman & Savitt, 1989). Más recientemente, mediante fusión génica se demostró que la proteína híbrida β -galactosidasa-fragmento C se distribuye en las neuronas del sistema hipoglosal por transporte retrógrado y transináptico tras su inyección en la lengua de ratón, observando que la actividad enzimática se mantenía incluso en los cuerpos neuronales de las segundas neuronas (Coen *et al.*, 1997).

2.3.3. Trazadores neuronales: Aplicaciones clásicas de la toxina tetánica

El objetivo fundamental del uso de trazadores neuronales es el mapeo de las conexiones anatómicas entre las distintas estructuras del sistema nervioso central. Debido a las características mostradas por la toxina tetánica, no es de extrañar que fuese uno de los trazadores utilizados en un primer lugar (Greitz *et al.*, 1973; Price *et al.*, 1975). Sin embargo, su poder patógeno frenó en gran medida su utilización hasta que se descubrieron las características no tóxicas del TTC, que como ya hemos comentado, mantiene las propiedades de transporte retrógrado y transináptico del TTC.

El desarrollo de nuevos trazadores neuronales, así como de marcadores, ha revolucionado la neurobiología en los últimos 30 años, y aunque se han desarrollado numerosos métodos, todos ellos se basan en el mismo principio, el transporte axonal. Una de las claves para comprender el funcionamiento, el desarrollo y la flexibilidad de las redes neuronales, es conocer como se encuentran conectadas entre sí las neuronas en el sistema nervioso central. De hecho, existen numerosos equipos en el mundo interesados en este campo y que estudian las características de diversos trazadores con la finalidad de establecer auténticos mapas neuronales. El fenómeno del transporte axonal fue descubierto en 1948 por Weiss y Hiscoe. Fue mucho más tarde cuando se descubrió que existía un transporte axonal rápido, tanto retrógrado como anterógrado, y un transporte axonal lento solamente retrógrado (Kandel *et al.*, 2000).

Por tanto, podemos dividir los trazadores neuronales en anterógrados y retrógrados (Figura 8). En términos prácticos, el transporte retroaxonal permite identificar las células que son el origen de fibras nerviosas que llegan a una región, mientras que el transporte anterógrado nos permite conocer sobre qué estructura(s) proyecta un determinado grupo de células del sistema nervioso central. En el caso del transporte retrógrado, el trazador se administra en la región inervada y entra en el axón para alcanzar de manera retroaxonal el cuerpo celular (Kobbert *et al.*, 2000).

Se puede considerar que los primeros intentos de mapeo retrógrado se realizaron mediante la degeneración de fibras. La destrucción de una determinada región en el cerebro produce la

degeneración retrógrada de los axones que proyectan sobre dicha zona, y de las células que son el origen de dicha vía neuronal. El recorrido de las fibras y células en degeneración podía ser visualizado muy fácilmente mediante diversas técnicas de tinción con plata (Nauta & Gyax, 1954; Fink & Heimer, 1967). Desde entonces se han desarrollado un amplio número de trazadores retroaxonales, alguno de los cuales pasaremos a describir.

El primer trazador retrógrado utilizado fue la *HRP* (*Horseradish peroxidase* o *Peroxidasa del rábano*), siendo su descubrimiento un gran avance en este campo (Kristensson & Olsson, 1971). Se trata de una enzima que tiene la capacidad de poder penetrar en las terminaciones axonales y ser transportada de manera retrógrada hasta el cuerpo neuronal en el interior de unas vesículas, donde permanece. La gran ventaja de esta molécula es su gran facilidad de detección, ya que su actividad enzimática produce un precipitado marrón cuando reacciona con el agua oxigenada y la diaminobenzidina (DAB). Este precipitado es estable y claramente visible, pero además es electrondenso, lo que permite que el marcaje pueda estudiarse a nivel ultraestructural. El mayor inconveniente es que no hay paso transináptico, por lo que sólo veremos el cuerpo de la primera neurona (Kobbert *et al.*, 2000).

Las *lectinas* se caracterizan por su alta afinidad por azúcares específicos. Tras unirse a glicoconjugados de la membrana neuronal, penetran en el axón y son transportados hasta el soma neuronal. En este caso, existe cierto paso transináptico aunque con muy baja eficacia (Wan *et al.*, 1982). Dentro del grupo de las lectinas, el trazador más utilizado es la aglutinina del grano de trigo (WGA o *wheat germ agglutinin*). Su detección se puede realizar mediante anticuerpos específicos, aunque para facilitarla, generalmente se utiliza conjugada a enzimas como la HRP,. Se ha comprobado que la fusión de WGA-HRP es cuarenta veces más sensible que la HRP sola, probablemente debido a una mayor especificidad y eficacia de la WGA (Gonatas *et al.*, 1979; Trojanowski *et al.*, 1982; Wan *et al.*, 1982).

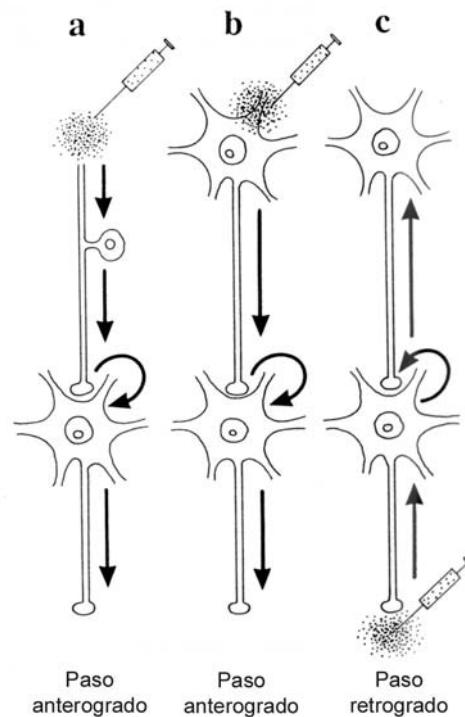


Figura 8. Tipos de trazadores neuronales según su transporte. (a y b) Transporte anterógrado desde una célula sensorial periférica bipolar (a) y desde una neurona multipolar (b) hacia neuronas postsinápticas. (c) Transporte retrógrado, por ejemplo desde las neuronas motoras hacia las neuronas premotoras.

Los *virus* son otra de las estrategias utilizadas para este tipo de estudios, sobre todo el virus de la rabia y los herpes virus (Norgren & Lehman, 1998; Kelly & Strick, 2000). En ambos casos se trata de virus altamente neurotróficos capaces de viajar retrograda y transinápticamente a través de una amplia red neuronal. Su característica más interesante es que son fácilmente detectables debido a que se replican en las neuronas, magnificando la señal (Figura 9) (Kuypers & Ugolini, 1990; Ugolini, 1995b; Norgren & Lehman, 1998). Como desventaja, señalar que esta replicación produce la lisis y degeneración de las neuronas afectadas, especialmente en el caso del herpes virus. Esta propiedad hace que los virus puedan difundir no sólo a neuronas conectadas a la primera sino también a estructuras vecinas, dando una señal inespecífica (Figura 10) (Ugolini, 1995b; Norgren & Lehman, 1998; Kelly & Strick, 2000; Kobbert *et al.*, 2000).

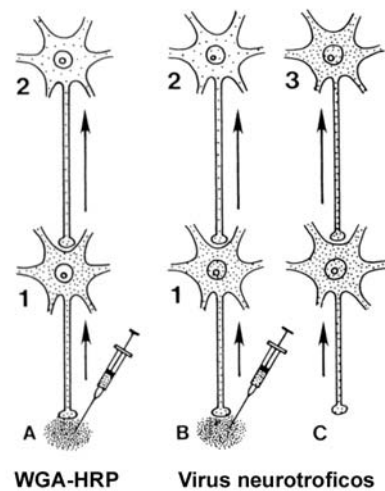


Figura 9. Comparación de los distintos grados de intensidad de la señal obtenida con los trazadores neuronales retrógrados no virales (A) y los víricos (B y C). Con los no virales (WGA-HRP, por ejemplo) sólo se transfiere una pequeña cantidad desde las neuronas de primer orden a las neuronas de segundo orden, obteniendo como resultado un marcaje relativamente débil. (B y C) Con los trazadores víricos, tras la transferencia a las neuronas de segundo grado, se produce una replicación viral que se traduce en un intenso marcaje.

Además, esta degeneración neuronal llega a producir una sintomatología grave en el animal, muriendo en el transcurso de la primera semana (Kelly & Strick, 2000; Kobbert *et al.*, 2000). Por tanto, el mayor inconveniente de este tipo de trazadores es el alto riesgo que supone su manejo y el de los animales infectados, que pueden transmitir estos virus incluso en las fases asintomáticas de la infección (Norgren & Lehman, 1998; Kelly & Strick, 2000). De hecho, el herpes virus y el virus de la rabia están catalogados en el grupo 2 y 3 respectivamente, es decir, que pueden causar enfermedades graves en aquellos que los manejan (Real Decreto 664/1997 para la protección de los trabajadores contra los riesgos relacionados con la exposición a agentes biológicos durante el trabajo), lo que implica la necesidad de trabajar en laboratorios de seguridad (P3).

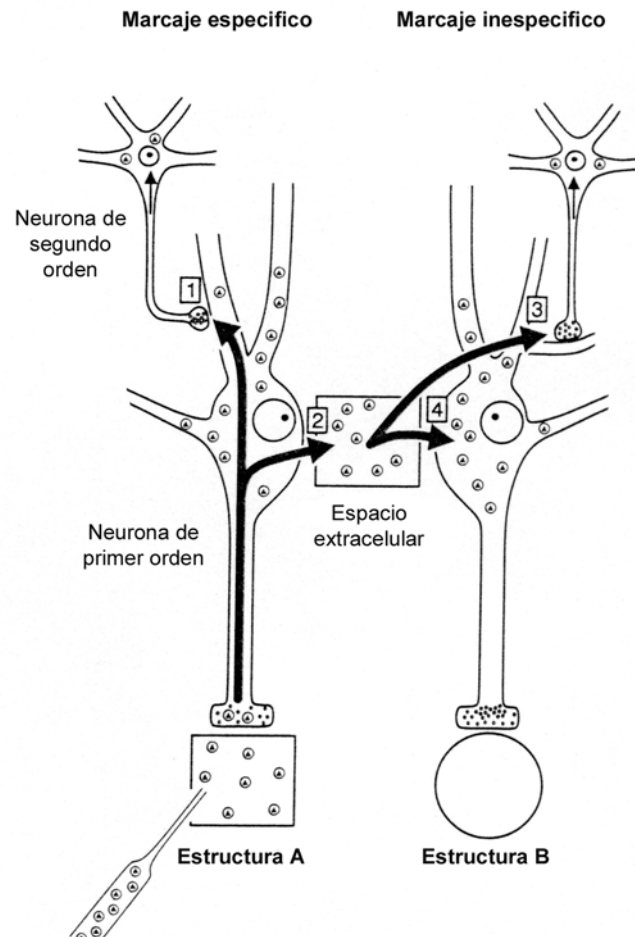


Figura 10. Diferentes patrones específico y no específico de los trazadores neuronales retrógrados. Cuando el trazador se inyecta en la estructura A, el virus es transportado retrógradamente a través de las neuronas que inervan esta estructura y entonces pasar transinápticamente de manera específica a neuronas de segundo orden que hacen sinapsis con la primera (1). De manera alternativa, el virus puede difundir en el espacio extracelular (2), uniéndose a neuronas que no están relacionadas con las primeras (3), o infectar neuronas vecinas (4). Esto dará como resultado un marcaje no específico.

Por último, describiremos las *toxinas*, muy utilizadas como trazadores, entre las que hay que destacar la toxina tetánica y en particular el TTC. Dicho fragmento ya se ha utilizado en el estudio del sistema ocular (Horn & Buttner-Ennever, 1990) o el sistema hipoglosal (Fishman *et al.*, 1992). Debido a su difícil detección mediante anticuerpos, diversos equipos fusionaron el TTC a diversas enzimas como la HRP (Fishman & Savitt, 1989) o la β -galactosidasa (esta

última mediante fusión génica) (Coen *et al.*, 1997), para facilitar su detección. De esta forma se demostró que dicha actividad enzimática se mantenía incluso después de atravesar una sinapsis (Fishman & Savitt, 1989; Coen *et al.*, 1997), ya que la detección podía realizarse gracias a la actividad biológica de la enzima fusionada. Como la HRP, la β -galactosidasa produce un precipitado azul que puede ser detectado fácilmente y que además es electrodenso, por lo que también pueden realizarse estudios ultraestructurales de la localización del TTC.

Otro dato interesante era la existencia de indicios de que la acción de la toxina tetánica (y por tanto su paso transináptico) dependería de la actividad neuronal (Ponomarev, 1928; Kryzhanovsky, 1958; Hughes & Whaler, 1962; Wellhoner *et al.*, 1973), aunque no existían pruebas concluyentes. Si este hecho pudiese demostrarse, sería particularmente interesante ya que significaría que el trazador no difunde a través de dos neuronas simplemente próximas sino que además deben estar funcionalmente conectadas, marcando así redes neuronales funcionalmente activas.

Debido a las propiedades del TTC y sus ventajas frente a otros trazadores neuronales, resultaría interesante caracterizar mejor su modo de transporte, en especial todo lo que se refiere a la influencia de la actividad neuronal en el mismo.

MATERIAL Y MÉTODOS

3. Material y métodos

La presentación del presente capítulo viene supeditado a la presentación del apartado de resultados y discusión que se presenta en forma de artículos. A pesar de que en cada uno de ellos se describe la metodología utilizada, hemos creído conveniente una descripción más detallada de la misma.

La infraestructura utilizada en el presente trabajo está disponible actualmente en el Departamento de Anatomía, Embriología y Genética de la Facultad de Veterinaria de Zaragoza; Departamento de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza; Unidad de Experimentación Animal; Departamento de Anatomía Patológica de la Facultad de Medicina de Zaragoza; Departament d'Embryologie Moleculaire del Instituto Pasteur de París.

Se han utilizado 118 ratas hembra Wistar y cincuenta ratones hembra CD1 procedentes de IFFA CREDO®, en óptimas condiciones sanitarias con controles bacteriológicos, parasitológicos y serológicos satisfactorios. Dichos animales fueron alojados en el Servicio de Apoyo de la Universidad de Zaragoza de Biomedicina y Biomateriales con número de registro 50297-18A; y en el animalario del Instituto Pasteur de París, respectivamente, con acceso a comida y bebida *ad libitum* durante toda la experiencia.

3.1. Construcciones genéticas utilizadas

Para la producción proteica y la expresión en células eucariotas, fueron utilizadas las siguientes construcciones:

-Plásmido pCMV-LacZ. Contiene el gen marcador β -galactosidasa bacteriana cuya expresión viene controlada también por el promotor CMV. Otorga resistencia a las bacterias frente a la ampicilina (Figura 11).

-Plásmido pCMV-LacZ-TTC. Es un plásmido de 8519 pares de bases. Presenta el gen de resistencia frente a la kanamicina. Incluye el gen de fusión de la β -galactosidasa bacteriana con el fragmento C de la toxina tetánica precedido del promotor CMV, gracias al cual es capaz de expresarse en células eucariotas (Figura 11).

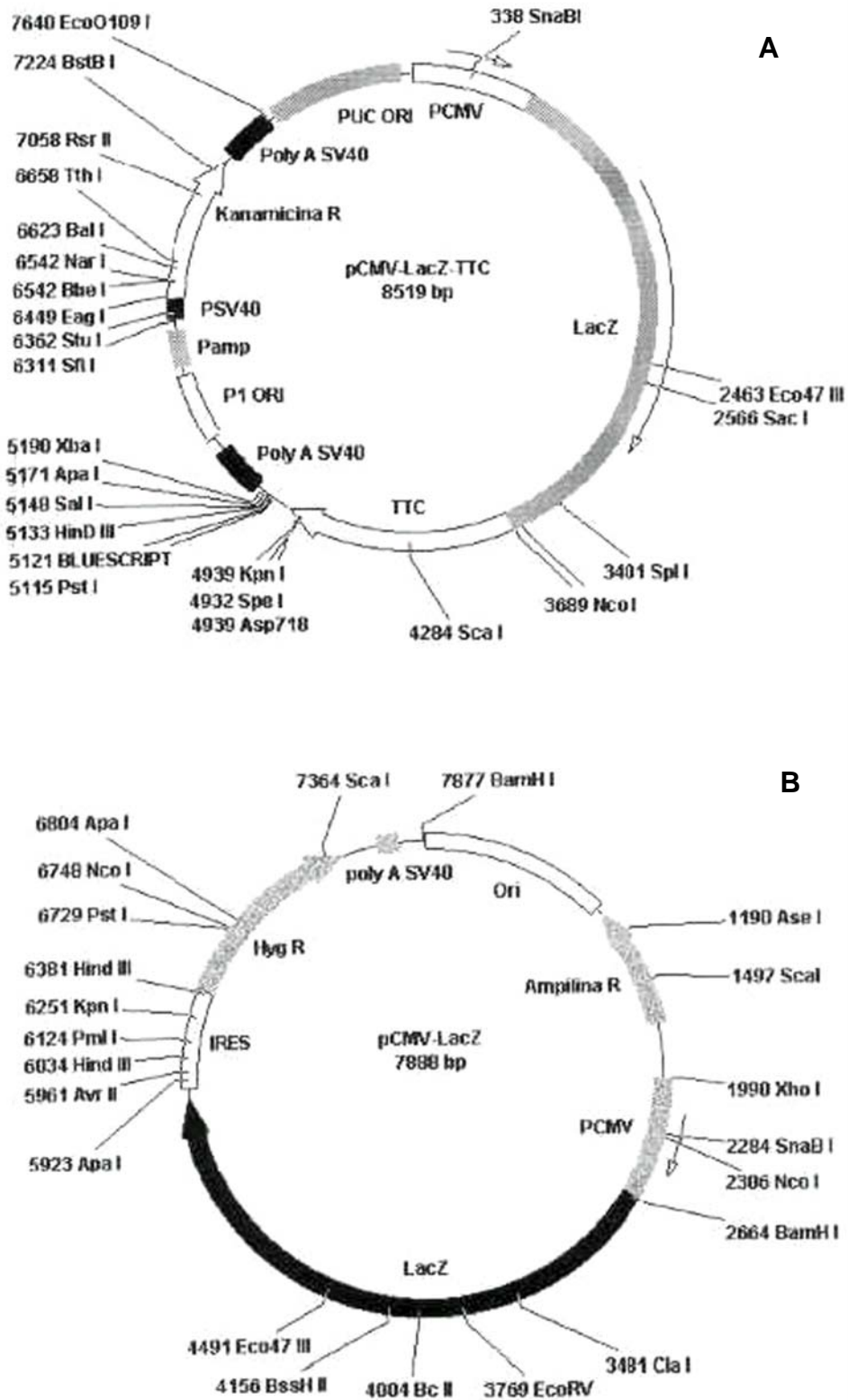


Figura 11. A) Plásmido que codifica la proteína híbrida β -gal-TTC bajo el promotor CMV para células eucariotas. B) Plásmido que codifica la β -galactosidasa citoplásmica en células eucariotas.

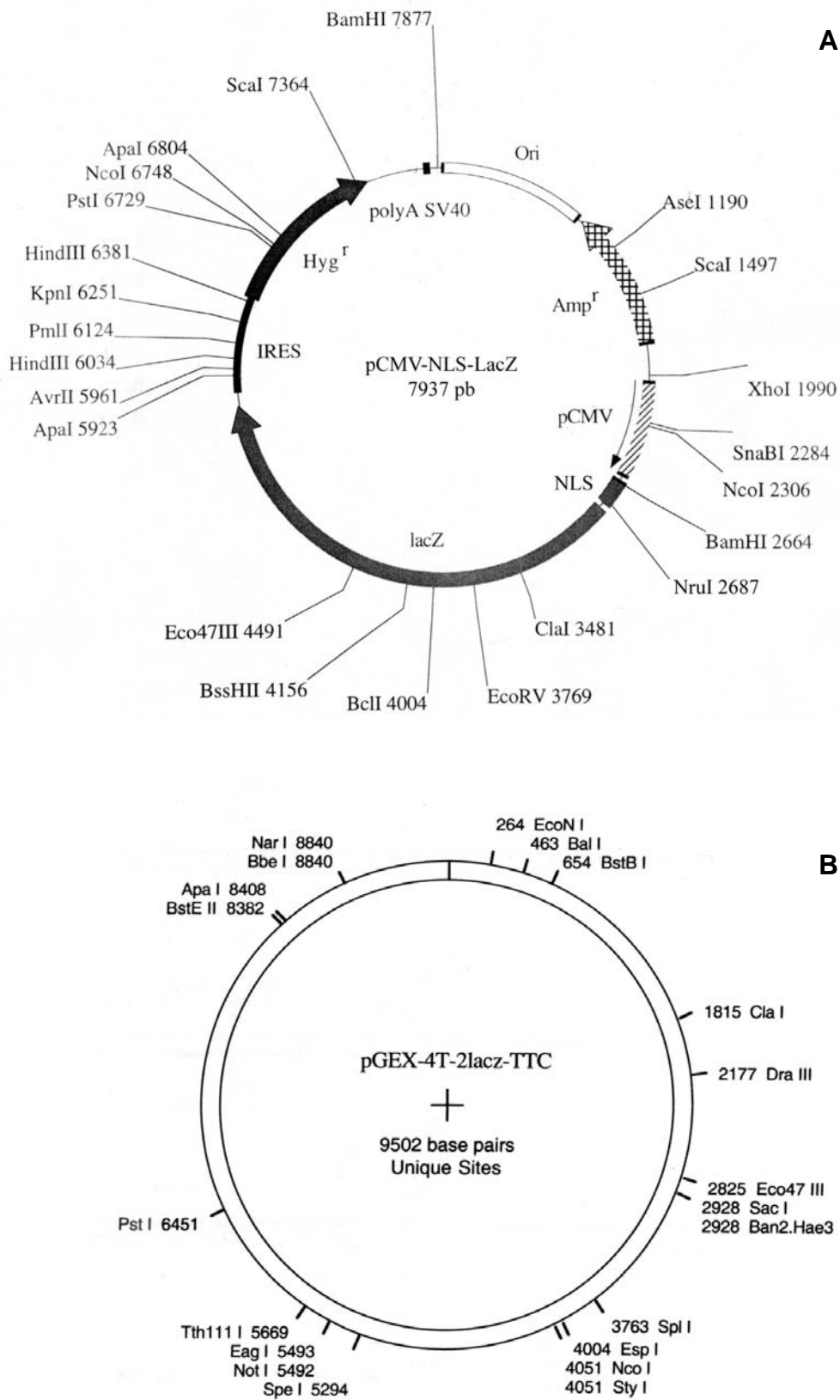


Figura 12. A) Plásmido pCMV-NLS-LacZ que codifica la enzima β -galactosidasa con localización nuclear. **B)** Plásmido utilizado para la obtención de proteína híbrida β -gal-TTC.

-Plásmido pCMV-NLS-LacZ (Coen L., comunicación personal). Contiene el gen que codifica la enzima β -galactosidasa bacteriana bajo control del promotor del *citomegalovirus* (CMV). Así mismo contiene una señalización nuclear y el gen de resistencia a la kanamicina (Figura 12).

-Plásmido pGEX-LacZ-TTC (Coen *et al.*, 1997), que presenta el gen de la resistencia a la ampicilina. Contiene el gen de la proteína de fusión β -galactosidasa bacteriana con el fragmento C de la toxina tetánica bajo el control del promotor SV-40 (Figura 12).

3.2. Obtención de las moléculas

3.2.1. Obtención de la proteína híbrida

3.2.1.1. Purificación de la proteína

El proceso se llevó a cabo mediante cromatografía de afinidad. La transformación bacteriana con el plásmido pGEX-LacZ-TTC se ha realizado mediante electroporación utilizando la cepa bacteriana *E. Coli XL1-Blue*. Las bacterias transformadas se siembran en tubos con 5ml de medio LB líquido con una concentración de 10mg/ml de ampicilina. Se dejan en agitación durante toda la noche a 37°C y a la mañana siguiente se diluyen 10 veces en 1 litro de LB con ampicilina. Se dejan a 30°C en agitación hasta que la densidad óptica alcanza un valor entre 0,4 y 0,6 para producir la inducción añadiendo IPTG 1mM y MgCl₂ 1mM. A partir de este momento el cultivo se deja en agitación durante 90 minutos a 30°C para evitar la formación de cuerpos de inclusión.

Se centrifuga el cultivo a 6000rpm durante 20 minutos a 4°C. Se elimina el sobrenadante y se resuspende el depósito bacteriano con 25ml de *tampón de recogida* a 4°C por litro de cultivo inicial.

-Tampón de *recogida* presenta la siguiente composición:

- TRIS 0,1M pH 7,8
- NaCl 0,1M
- EDTA 10mM
- 20% Glicerol
- Lysozima 1mg/ml
- DTT 4mM
- 0,1% Triton X-100
- 1 pastilla de mezcla de antiproteasas (Farmacia)

La suspensión de bacterias se lisa mediante altas presiones en la prensa de French para liberar la proteína híbrida de las bacterias. Se recoge el lisado y se mantiene a 4°C. Para centrifugarlo a 30000rpm durante 15 minutos. Tomamos el sobrenadante y se almacena a 4°C para posteriormente ponerla en contacto con la matriz.

Por otra parte se prepara la resina o matriz (*Glutathione Sepharose 4B*) añadiendo 10 volúmenes de PBS para eliminar el etanol en la que está conservada. Se centrifuga a 3000rpm durante 10 minutos a 4°C y se retira el sobrenadante. A la resina se le añaden 50ml de la suspensión obtenida tras la ultracentrifugación. Se mezclan ligeramente y se dejan en agitación suave a 4°C durante toda la noche para conseguir que la proteína quede ligada a la matriz.

Al día siguiente es necesario realizar el lavado progresivo de la matriz con la proteína para eliminar las proteínas bacterianas. Tras centrifugar a 3000rpm durante 10 minutos a 4°C se elimina el sobrenadante del cultivo. Posteriormente se realizan 3 lavados mediante la adición de 50ml de tampón de lavado manteniéndolos 30 minutos en agitación suave a 4°C. La centrifugación para eliminar el sobrenadante de la matriz se realiza a 3000rpm durante 5-10 minutos para evitar su apelmazamiento.

La composición del tampón de lavado es:

- TRIS 0,1M pH 7,8
- NaCl 0,1M
- EDTA 10mM
- DTT 4mM
- 1 pastilla de mezcla de antiproteasas (Pharmacia)

Tras estos lavados es necesario eliminar las antiproteasas mediante 2 lavados con PBS ya que podrían interferir con la trombina que posteriormente utilizaremos. Tras este último lavado, se introduce la matriz en un tubo *Ependorf* de 1,5ml. y se centrifuga a 3000rpm para eliminar el resto de sobrenadante. Se añaden 600 μ l de PBS y de trombina a una concentración de 10 unidades/ml, dejándose en agitación suave toda la noche a 4°C. Durante este proceso hemos lavado la matriz de impurezas y por medio de la trombina, se rompe la unión existente entre la proteína híbrida y la matriz, de manera que la proteína quedará libre en el medio.

Tras la incubación con trombina tomamos el sobrenadante, que contiene la proteína mediante centrifugación introduciéndolo en tubos tipo *Centricon 100* para concentrar la proteína obtenida.

3.2.1.2. Visualización y cuantificación de la proteína obtenida

El cálculo de la concentración de la proteína obtenida se realizó mediante espectrofotometría (280nm). La concentración de las dosis administradas de proteína fue de 1 μ g/ μ l en todos los casos.

La visualización y verificación de la talla de la proteína híbrida obtenida se realizó mediante la técnica *western blot*. En primer lugar, se prepara un gel de acrilamida con una concentración del 5% en la parte superior y un 10% en la parte inferior.

-Gel de separación. Preparación para dos geles al 10%:

-H ₂ O	4,53ml
-Acryl 30%	3,69ml
-Tampón de separación	2,85ml
-Tris base	18,17g
-SDS 10%	4ml
-Ajustar a 100ml de H ₂ O. pH 8,8. Conservar a T.A.	
-APS 25%	68µl
-Temed	7,5µl

-Gel de concentración. Preparación para dos geles al 5%:

-H ₂ O	3,75ml
-Acryl 30%	1,25ml
-Tampón de concentración	1,65ml
-Tris base	30g
-SDS 10%	4ml
-Ajustar a 100ml de H ₂ O. pH 6,6. Conservar a T.A.	
-APS 25%	42µl
-Temed	18,75µl

-Tampón de migración 10X:

-Tris base	30g
-Glicina	144g
-SDS 10%	100ml
-Añadir hasta 1 litro de H ₂ O.	

Se carga la proteína y se hace migrar mediante electroforesis. Se monta el sistema de transferencia (Kit ECL[®]), recortando papel Whatman y membranas ECL haciéndolas coincidir con la talla del gel, y se saturan durante 10 minutos con el tampón de transferencia. La transferencia se realiza durante 90 minutos a 100 voltios.

-Tampón de transferencia Biorad 10X

-Tris base 3.75g

-Glicina 19.25g

-Metanol 200ml

-Añadir hasta 1 litro de H₂O.

El revelado se realizará mediante los anticuerpos que se describen a continuación. La talla de nuestra proteína híbrida debe corresponder a 180KDa.

-Anticuerpos primarios:

-Anticuerpo anti-TTC policlonal de conejo (1:500; Calbiochem)

-Anticuerpo anti-β-galactosidasa policlonal de conejo (1:500; Cappel)

-Anticuerpo secundario:

-Anticuerpo anti-globulinas de conejo (1:1000; Cappel)

3.2.2. Obtención del ADN desnudo

3.2.2.1. Purificación

La transformación de las bacterias DH5α se ha realizado mediante choque térmico. Las bacterias se siembran en placas de Petri con el antibiótico kanamicina (10mg/ml) en el caso de los plásmidos NSL-CMV-LacZ y CMV-LacZTTC, o ampicilina (50mg/ml) en el caso del pCMV-LacZ. Se dejarán en la incubadora a 37°C toda la noche. Posteriormente se procederá al crecimiento en medio líquido de las colonias, durante toda la noche, en tubos de 5 ml de LB con el respectivo antibiótico. Para finalizar, 4 tubos de 5ml se introducirán en 250ml LB para dejarlo en crecimiento de nuevo toda la noche. El crecimiento en medio de cultivo se realizan en incubadora orbital a 37°C y 200rpm.

La purificación del plásmido se realizó con el kit *EndoFree Plasmid Maxi* de QIAGEN®. Su uso está indicado para la terapia génica ya que es capaz de eliminar las endotoxinas bacterianas durante el proceso de extracción del plásmido. Es importante su utilización ya que estas endotoxinas son capaces de producir en el animal fiebre, shock endotóxico o la activación de la

cascada del complemento, además pueden reducir notablemente la eficiencia en la transfección de células eucariotas (Weber *et al.*, 1995).

3.2.2.2. Visualización y cuantificación

La visualización y verificación de la talla del plásmido obtenido se realizó mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en TBE 1X (Tris-Bórico-EDTA) mediante tinción con bromuro de etidio y observación con rayos ultravioleta

Se colocan 10µl de la solución obtenida tras la maxiprep, más 2µl de Bromofenol que dará peso a la muestra e indicará del corrido electroforético. Así mismo, se colocará un marcador de talla que sirva de referencia a la talla del plásmido. Tras la comprobación de la talla, se procederá al cálculo de la cantidad de ADN obtenido mediante espectrofotometría (260nm). Con ayuda del speed-vac lograremos llegar a las concentraciones que nos interesen (tabla 4) para posteriormente alicuotar el ADN y conservarlo a -20°C hasta su empleo.

3.3. Inyección intramuscular de las moléculas

En el caso del ADN, se colocó al animal anestesiado en *decúbito supino* y se inyectó abordando la lengua desde su parte dorsal. Se administraron diferentes dosis, tanto por la cantidad de ADN administrado como por el volumen inyectado. Se realizó una corrección para administrar el mismo número de copias de cada plásmido, ya que cada uno de ellos posee un peso molecular diferente (Cuadro 3).

	CMV-Lac Z citop/nucl.	CMV-Lac Z-TTC
Dosis Altas	300µg/300µl	390µg/300µl
Dosis Bajas	100µg/100µl	130µg/100µl

Cuadro 3. Dosis utilizadas en el trabajo.

Un protocolo similar fue utilizado en las inyecciones de proteína híbrida en la lengua. Para la inyección de proteína en el músculo gastrocnemio, se procedió a anestesiarse al animal con pentobarbital. Bajo anestesia, se afeitó la extremidad posterior del animal y se procedió a

inocular la proteína con ayuda de una jeringuilla de insulina en el músculo gastrocnemio. En ambos casos, el volumen de proteína inoculado fue de 30 μ l a una concentración de 1 μ g/ μ l. Durante todo el proceso, es de vital importancia mantener las condiciones de máxima esterilidad para evitar posibles infecciones en el animal.

3.3.1. Sistema hipoglosal

El sistema hipoglosal es uno de los sistemas más utilizados para el estudio de trazadores, debido a que es bien conocido. Las conexiones neuronales del sistema hipoglosal han sido caracterizadas gracias a estudios con trazadores virales tales como virus herpes y de la rabia (Ugolini, 1995a, 1995b). También se utilizó para demostrar el transporte retrógrado y transináptico del fragmento C (Fishman & Carrigan, 1987; Fishman *et al.*, 1992) y para el estudio del comportamiento de la proteína de fusión β -galactosidasa-fragmento C (Coen *et al.*, 1997).

En este sistema, el núcleo hipogloso o núcleo XII, constituye el centro motor que controla el movimiento de la lengua mediante el nervio motor XII.

Los cuerpos celulares de las motoneuronas del núcleo XII proyectan sus axones hacia la lengua, con la cual establece placas motoras. Además, las terminaciones axonales de otras neuronas establecen contactos sinápticos con estas motoneuronas. El conjunto de este sistema forma una cadena de neuronas conectadas las unas con las otras permitiendo así el paso de información química y/o eléctrica que se traducirá en el movimiento de la lengua. En este circuito neuronal, las motoneuronas se llaman de primer orden y las otras son denominadas de orden superior (2 $^{\circ}$, 3 $^{\circ}$...), donde cada orden corresponde al paso de una neurona a otra mediante sinapsis.

El sistema nos resultó el idóneo para el estudio de la expresión en el músculo de la lengua del ADN que codifica la proteína híbrida β -galactosidasa-fragmento C, así como para el transporte de la proteína híbrida a nivel ultraestructural y para el estudio de su cinética.

3.3.2. Placa motora

Para el estudio de la influencia de la actividad sobre el transporte de la proteína, se eligió como modelo la placa motora, región especializada de la membrana muscular donde el axon de la motoneurona inerva al músculo. Estructuralmente, la placa motora se compone de un lado presináptico (neurona) y otro postsináptico (músculo) separados por una hendidura de unos 100nm. La acetilcolina, neurotransmisor liberado en la placa, se almacena en pequeñas vesículas del lado presináptico de la placa, y es liberada a la hendidura sináptica con la llegada de los impulsos nerviosos. El lado postsináptico contiene un alto número de receptores de la acetilcolina, así como abundantes canales de sodio (Kandel *et al.*, 2000).

Se han realizado numerosos estudios sobre su función, desarrollo y estructura, trasladando posteriormente los resultados a la sinapsis interneuronal (Sanes & Lichtman, 1999). Tal es la accesibilidad y los conocimientos que se poseen sobre la placa motora, que muchos autores la consideran como la *E. coli* de las sinapsis (Hall & Sanes, 1993).

3.3.3. Sistema gastrocnemio-ciático

Como hemos explicado previamente, el modelo utilizado para el estudio de la influencia de la actividad sobre el transporte de la TTC fue la placa motora, y en concreto el sistema gastrocnemio-ciático, debido a la fácil accesibilidad del nervio ciático para su manipulación. El origen de este nervio en el ratón es la unión de las tres primeras ramas del sacro y la cuarta y quinta lumbares. En realidad son dos nervios (tibial y peroneo) envueltos por un tejido conectivo común. En su recorrido abandona la pelvis a través del foramen ciático mayor para posteriormente descender a lo largo del miembro de manera paralela al fémur. Es en este punto donde llevaremos a cabo todas las manipulaciones del nervio. El nervio ciático inerva un amplio paquete de músculos de la parte posterior de la pata trasera del animal, incluido el músculo gastrocnemio. Este sistema neuro-muscular ha sido utilizado ampliamente por otros autores para el estudio del comportamiento de otras sustancias incluida la toxina tetánica (Price *et al.*, 1975; Buffelli *et al.*, 1997).

3.3.3.1. Denervación del músculo gastrocnemio mediante axotomía

Bajo anestesia profunda, se procedió a afeitar la piel de la extremidad posterior del animal. Con ayuda de un bisturí, se realizó una incisión longitudinal, paralela al fémur, en la piel de la región lateral del muslo. Con unas pinzas se levantó el músculo tensor de la fascia lata, dejando al descubierto el nervio ciático, claramente reconocible por su gran tamaño. A continuación se seccionaron 5mm del nervio en su porción más proximal, para asegurarnos de que el músculo gastrocnemio quedaba denervado.

Los animales mostraron en los días sucesivos una cojera ostensible. Se revisó a diario la ausencia de reflejos en la pata trasera intervenida. Además, en la necropsia de estos animales, se confirmó en todos los casos la sección del nervio. Como control, se inyectó la proteína contralateralmente en el músculo inervado.

3.3.3.2. Denervación mediante tetrodotoxina

La tetrodotoxina (TTX) es una potente neurotoxina marina producida por el pez del género *Fugu* y que actúa bloqueando los canales de sodio del sistema nervioso. Ha sido utilizada en estudios previos de la placa motora (Cormery *et al.*, 2000; Costanzo *et al.*, 2000). Debido a la altísima toxicidad de la TTX, no pudo inyectarse de manera directa en el músculo sino que tuvo que ser administrada paulatinamente a muy bajas concentraciones mediante una microbomba osmótica Alzet 1007D (Barry & Ribchester, 1995). Se llenó la microbomba con una solución de TTX (500µg/ml). Con el animal bajo anestesia profunda, se fijó subcutáneamente en la zona dorsal y se conectó mediante un capilar de polietileno (PE60) a un anillo de silicona que rodeaba una porción del nervio ciático. De esta forma, la TTX era liberada muy lentamente y a muy bajas concentraciones de manera local, ya que el anillo de silicona evitaba su difusión. Este bloqueo se mantuvo durante 4 días. Cada día se verificó la ausencia de reflejos de extensión o flexión en la pata del animal, indicando un bloqueo completo y continuo de la conducción nerviosa. Como control, se implantó de la misma manera una microbomba osmótica con solución salina estéril comprobando que no se produjo bloqueo del nervio.

Se inyectó la proteína híbrida LacZ-TTC en el músculo gastrocnemio bilateralmente a los 4 días de ser implantada la microbomba.

3.3.3.3. Denervación mediante bungarotoxina

La bungarotoxina (BTX) es una toxina aislada a partir del veneno de la serpiente *Bungarus multicinctus*. Su descubrimiento supuso una revolución en el estudio del sistema neuromuscular (Chang & Lee, 1963). La toxina se une específicamente y con una alta afinidad a la subunidad α de los receptores de la acetilcolina. De hecho, es un ligando ideal para la localización de placas motoras en el músculo y su bloqueo (Bambrick & Gordon, 1994).

En este caso, el bloqueo neuromuscular se realizó mediante la inyección directa de bungarotoxina ligada a tetrametilrodamina (BTX, Calbiochem: 6 μ g/30 μ l) en el músculo gastrocnemio izquierdo del animal bajo anestesia profunda 30 minutos antes de inyectar la proteína híbrida LacZ-TTC. La parálisis del miembro era evidente al recuperarse de la anestesia y durante las siguientes horas.

3.4. Obtención de órganos de interés

Es importante destacar que a partir de este punto, tanto los tampónes utilizados como los órganos extraídos, deberán mantenerse a 4°C para evitar la degradación de los tejidos o de la proteína.

3.4.1. Sacrificio de los animales y fijación

Los animales fueron sacrificados mediante perfusión vía intracardiaca. La anestesia se realizó con *pentobarbital* (75mg/Kg) vía intraperitoneal.

Los tiempos de sacrificio fueron diferentes dependiendo del estudio realizado. En el caso del estudio de la expresión del ADN se sacrificó a los animales 1, 2, 4, 7, 15, 30 o 60 días postinyección. En el caso del estudio del transporte proteico, tanto de su cinética como de su localización, los animales fueron sacrificados 2, 6, 12, 24 o 48 horas postinyección.

En primer lugar, perfundimos al animal con 50ml. de una dilución de PBS con 1% de heparina a 4°C. De esta forma el circuito sanguíneo se irá limpiando y la sangre será sustituida paulatinamente por el tampón. Es especialmente interesante eliminar toda la sangre ya que

interfiere en los estudios que se realizarán posteriormente. Así mismo, es de vital importancia el conservar las soluciones en hielo.

Una vez perfundido el animal con los 50ml. de PBS, se fijan los tejidos haciendo pasar por el circuito 50ml. de una dilución a 4°C de paraformaldehído al 4% en PBS que permitirá su posterior manipulación.

3.4.2. Disección de órganos

Tras acceder a la cavidad craneal se extrae el cerebro. Posteriormente se introduce en PBS a 4°C. Se disecciona la lengua desde la faringe y se divide longitudinalmente en 3 o 4 partes para facilitar la entrada de solución de coloración y su posterior estudio. En el caso del estudio de la influencia de la actividad sobre el transporte de la proteína, se diseccionó el músculo gastrocnemio. Las muestras se introducen en PBS a 4°C para proceder al lavado por agitación durante 5-10 minutos 3 veces.

3.5. Procesado de las muestras

Dependiendo del estudio que vaya a realizarse, el procesado que seguirán las muestras será diferente. Pasamos a exponerlo a continuación.

3.5.1. Análisis *in toto*

Una vez realizado el lavado de las muestras con PBS, se colocan en inmersión en el tampón de coloración en agitación durante toda la noche a 37°C y protegidos de la luz.

-El tampón de coloración sirve de sustrato a la enzima β -galactosidasa bacteriana y servirá para su detección e identificación. Dicha reacción produce un precipitado de color azul:

- Sol. 0.8mg/ml de X-Gal (5-Bromo-4-cloro-3-indolyl- β -D-galactosido)
- Ferrocianuro potásico ((CN)₆FeK₄·3H₂O) 4mM.
- Ferricianuro potásico (K₃(FeCN)₆) 4mM.
- Cloruro magnésico (Cl₂Mg·6H₂O) 4mM.

Transcurrido este tiempo, se lavan las muestras por agitación 3 veces con PBS a 4°C durante 5 minutos. Para una mejor observación de los tejidos a la lupa, se deshidratan en concentraciones sucesivas crecientes de glicerol. De esta manera, las muestras ya están preparadas para ser observadas a la lupa.

3.5.2. Análisis histológico

3.5.2.1. Microscopía óptica

Una vez realizado el lavado de las muestras, se dejan en inmersión en una solución 20% sacarosa en PBS a 4°C en agitación durante 24 horas. La sacarosa actúa como crioprotector evitando el deterioro de los tejidos cuando se realice la posterior congelación, mediante vapores de nitrógeno líquido. Además, para la protección de los tejidos, se embeben en una matriz crioprotectora (M-1 Embedding Matrix[®] de Lapshaw[®]). El bloque formado por la matriz y la muestra se conserva a 20°C bajo cero.

El tejido se corta en el criostato a -25°C y a un grosor de 20µm. Los cortes se depositarán sobre portas gelatinizados para evitar que se despeguen durante su manipulación posterior. Las muestras obtenidas se procesarán para la reacción de la enzima β-galactosidasa para posteriormente observarlas mediante microscopía óptica.

Los portas con los cortes se dejan en inmersión en la solución de coloración (ver apartado anterior) durante toda la noche a 37°C y protegidos de la luz. Posteriormente, los portas son lavados por inmersión en PBS para eliminar los restos de reactivo.

Para facilitar la visualización del marcaje, contrateñimos los portas con rojo nuclear durante 7 minutos a temperatura ambiente y protegidos de la luz para posteriormente lavarlos con agua corriente durante 10 minutos. El montaje de los mismos se realiza sin deshidratar el tejido, ya que ésto originaría la pérdida de la señal de la β-galactosidasa debido a los alcoholes utilizados en el proceso.

3.5.2.2. Microscopia confocal

Para el estudio de la influencia en la actividad en el transporte de la proteína a través del sistema ciatico-gastrocnemio, los cortes histológicos fueron sometidos a un análisis inmunohistoquímico:

-Para la identificación de la β -galactosidasa mediante anticuerpos se utilizó:

-Anticuerpo policlonal de conejo anti- β -galactosidasa (1:500; Cappel)

-Anticuerpo policlonal de cabra anti-inmunoglobulina de conejo conjugado con Alexa 488 (1:100; Molecular Probes). Con una excitación máxima de 488nm (longitud de onda correspondiente al verde).

-La identificación de las placas motoras del músculo y su visualización se realizó mediante BTX debido a su alta afinidad por las mismas aplicándola sobre los cortes histológicos (2 μ g/ml). La detección de la misma se realizó a longitudes de onda de 577nm (perteneciente al rojo), donde la rodamina tiene una emisión máxima.

Las diferentes fuentes de luz fueron utilizadas de manera aislada para evitar el cruce de señales entre el verde y el rojo.

3.5.3. Análisis ultraestructural

Una vez lavada la muestra, se deja en inmersión en la solución de X-Gal en PBS durante toda la noche en agitación a 37°C y protegida de la luz, tras la que se realizan 3 lavados de 5 minutos en PBS a 4°C.

Mediante una lupa diseccionamos las zonas de la lengua que se encuentren teñidas y que no deberán tener un volumen superior a 2mm³. Durante el proceso es de gran importancia el que dichas partes estén siempre inmersas en PBS para evitar que el tejido se deshidrate.

Una vez realizada la selección de las muestras, se procede a realizar una fijación más fuerte mediante inmersión en una solución de glutaraldehído 2.5% en PBS durante seis horas a 4°C.

Transcurrido este tiempo, se lavan estos bloques 2 veces durante 5 minutos en agitación con PBS.

Los bloques de tejido se depositan en tubos de cristal, inmersos en una solución 1% de tetraóxido de osmio (OsO_4) en PBS durante una hora en agitación suave a temperatura ambiente. Posteriormente se realizan 3 lavados con agua destilada durante 10 minutos, tras los cuales se incubarán durante una hora a temperatura ambiente en un solución de uranilacetato al 1% en agua destilada agitando suavemente. Es necesario eliminar perfectamente el PBS para evitar que el uranilacetato precipite. La muestra se deshidrata con baños sucesivos de acetona (soluciones de 25%, 50%, 75% y 95% de acetona en agua, y finalmente acetona 100%) de 30 minutos de duración en agitación suave a temperatura ambiente.

Tras la deshidratación, es necesario preparar las muestras para que sean cortadas. Para esto, se introducen en una solución bien homogeneizada 50% resina y 50% acetona y se dejan toda la noche a 4°C para posteriormente sumergirlas en resina pura e incubarlas a 40°C durante tres horas, evaporando así los restos de acetona. A continuación, la resina se sustituye por resina limpia y se deja incubando la muestra una hora más en las mismas condiciones.

-Resina de inclusión:

-EPON (Eter Glicerilado)	25gr.
-MNA	16gr.
-DDSA	8gr.
-DMP30	0,75ml.

Las muestras se depositan en moldes de goma, prestando especial atención a la orientación del tejido para que después sea cortado de manera óptima. Se llenan los moldes con resina pura., dejándolos en la estufa a 60°C durante 48 horas para que la resina polimerice. De esta forma el tejido queda incluido en la resina y listo para ser cortado.

Con el ultramicrotomo realizamos cortes del tejido de 50nm de grosor aproximadamente, que colocamos sobre una rejilla de cobre para pasar a su observación.

Para dar mayor contraste a las estructuras opacas a los electrones, teñimos estos cortes ligeramente con una solución de urilacetato al 1% en agua por inmersión durante 1 minuto aproximadamente. Tras el lavado con agua destilada, la muestra ya esta lista para ser estudiada al microscopio electrónico.

3.5.3. Estudio de proteínas totales en suero

Antes de perfundir a los animales, se les tomó una muestra de sangre del ángulo interno del ojo mediante un capilar. Se cuantificó la cantidad de albumina, α_1 -globulina, α_2 -globulina, β -globulina y γ -globulina por electroforesis en un capilar de silicio para separarlas y medir con una longitud de onda de 214nm (Paragon CZE[®] 2000). Las proteínas totales del suero se determinaron mediante la reacción de Biuret (Synchron CX[®] Delta of Beckman), tras la cual se midió la absorbancia a 545nm, por ser proporcional a la cantidad de proteína.

3.6. Metodología estadística

Para el análisis estadístico de los resultados referentes a la expresión del ADN se aplicó un análisis de varianza factorizado a tres vías. Para estudiar con más detalle la influencia del tiempo en la expresión de los plásmidos, los datos fueron sometidos al test estadístico de la t de Student para comprobar si existía una diferencia significativa de la expresión plasmídica a lo largo del tiempo y reagrupar los datos para aumentar los grados de libertad. Además se aplicó un análisis descriptivo de los distintos grupos.

Sobre las imágenes de fluorescencia obtenidas a partir de animales denervados como en los animales control, se aplicó un análisis estadístico mediante un test de la t de Student para confirmar que realmente existía una diferencia en la intensidad de marcaje de LacZTTC entre una placa motora con actividad nerviosa y una placa inactiva. La medida de la intensidad del marcaje se realizó mediante el programa LSM510 que incorporaba el microscopio confocal.

Los cálculos estadísticos y las gráficas de este trabajo se realizaron con los programas para PC *Harvey*, *Statistica v5.0* y *Excel 2000*.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4. Resultados y discusión

La presentación del capítulo de resultados y discusión será en forma de manuscritos (artículos publicados, enviados para su publicación o en preparación). Por eso, hemos creído conveniente realizar una pequeña introducción antes de la exposición de los mismos.

El primer objetivo que nos planteamos fue comprobar la llegada a córtex del fragmento C de la toxina tetánica. A pesar de que numerosos autores han realizado estudios tanto sobre la toxina entera como con el fragmento C, nunca se había detectado la llegada a córtex, ni en solitario ni en fusión con otra proteína. Este hecho era de gran importancia para su utilización en terapia génica, ya que como hemos expuesto en la revisión bibliográfica, el córtex se encuentra también afectado en algunas enfermedades que cursan con degeneración de las motoneuronas .

Mediante inyección proteica, demostramos que a las seis horas de la inyección intramuscular en la lengua, la actividad β -galactosidasa era detectada en las neuronas corticales (**Manuscrito 1**). Sin embargo, también observamos que si las inyecciones de proteína tenían lugar de forma consecutiva (varias inyecciones) existía una gran respuesta inmunitaria por parte del animal.

Ante estos antecedentes decidimos que si la proteína era producida de forma continua y en pequeñas dosis la respuesta inmunitaria por parte de los animales se vería disminuida. Para ello planteamos el estudio de la inyección de ADN desnudo en los animales para conseguir que las propias células musculares produjesen la molécula de fusión. Sin embargo, para que esta estrategia tuviese éxito era necesario conocer si el fragmento C, cuando es producido por las células musculares, es capaz de salir de las mismas con la actividad enzimática que le acompaña y alcanzar el sistema nervioso central.

El estudio de la expresión de la proteína híbrida se realizó a distintos tiempos tras la inyección de ADN desnudo en el músculo de la lengua. Para ello, se utilizaron un total de 98 ratas que se dividieron en tres grupos, y a cada uno de ellos se le administró un tipo de plásmido: pCMV-LacZ-TTC, pCMV-LacZ y pCMV-NLS-LacZ. A cada uno de estos grupos se le inyectó una dosis

baja de plásmido (100µg/100µl) y una dosis alta (300µg/300µl). La expresión de los plásmidos se controló a distintos tiempos (24 horas, 2 días, 4 días, 7 días, 15 días, 30 días y 60 días postinyección). Como control se inyectó Tris-EDTA (T.E.) intramuscularmente en la lengua, comprobándose la expresión a las 24 horas y a los 4 días.

Mediante el estudio histológico del tejido de la lengua y del cerebro, se comprobó que la proteína híbrida (β -gal-TTC) producida *in situ* por el músculo era capaz de salir de la fibra muscular que la producía para migrar retroaxonalmente y transinápticamente hasta el sistema nervioso central, manteniendo la actividad de la enzima fusionada y alcanzando distintos núcleos **(manuscrito 2)**. Por otra parte, mediante el recuento de las fibras transfectadas y el análisis estadístico de los datos, se estudió la influencia de tres factores sobre el nivel expresión del plásmido en el músculo: tipo de plásmido inyectado, dosis administrada y tiempo transcurrido desde la inoculación comprobándose que la presencia del TTC no ocasionaba ninguna influencia sobre la expresión. Sólo el tiempo transcurrido desde la inyección y la dosis de ADN administrada eran factores que modificaban el grado de expresión en el músculo **(manuscrito 3)**.

De manera paralela, se inyectaron los plásmidos pCMV-LacZ y pCMV-LacZ-TTC en diez ratones para el estudio ultraestructural de la proteína sintetizada por el músculo transfectado, demostrándose además que la proteína híbrida era capaz de salir de las fibras transfectadas y entrar en las células adyacentes **(manuscrito 2)**.

Por otra parte, para una posible utilización terapéutica del TTC, nos parecía interesante conocer las características de su transporte. La caracterización del transporte del TTC se realizó mediante la inyección directa de proteína β -gal-TTC en el músculo.

Mediante microscopía óptica se analizó la localización de la proteína en el SNC tras ser inyectada intramuscularmente en la lengua de 20 ratas a distintos tiempos: 2 horas, 6 horas, 12 horas, 18 horas, 24 horas, 48 horas y 72 horas postinyección. Como control, en cada uno de los tiempos se inyectó T.E. intramuscularmente en la lengua de un animal. Como ya hemos comentado, se comprobó que el β -gal-TTC era capaz de alcanzar neuronas de segundo y de tercer orden, incluidos centros superiores como el cortex. Al mismo tiempo, se estudió la

cinética del transporte de la proteína y sus características, demostrando su utilidad como trazador (**manuscrito 1**).

Otro punto de interés era conocer la localización del fragmento C durante su transporte en las motoneuronas. Mediante microscopía electrónica, se identificó la localización subcelular de la proteína híbrida en las distintas etapas del transporte de la β -gal-TTC. Se detectó que el TTC era capaz de entrar en la célula muscular, con un gran tropismo por la placa motora, localizándose asociado sobretodo a la membrana nuclear y distintos orgánulos. De la misma manera, se mostró que el TTC se transporta a través del axón asociado a vesículas hasta llegar al retículo endoplásmico rugoso en el cuerpo neuronal. Utilizando el sistema ciático-gastrocnemio, se demostró que el tropismo del TTC por la placa motriz, así como su entrada en la célula, depende de la actividad neuronal. Así mismo se demostró la utilidad de la proteína de fusión β -gal-TTC como una herramienta para el estudio de las conexiones del sistema nervioso central. Así puede ser utilizada para el estudio de la formación, desarrollo y plasticidad de la placa motora como modelo de la sinapsis del sistema nervioso central (**manuscrito 4**).

Fragment C tetanus toxin: A putative activity-dependent neuroanatomical tracer

Francisco J. Miana-Mena¹, Maria J. Muñoz², Jesus Ciriza¹, Joaquin Soria³, Philippe Brûlet⁴, Pilar Zaragoza¹ and Rosario Osta¹

¹Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, CP 50013, Zaragoza, Spain;

²Unidad de Farmacología, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, C/ Miguel Servet 177, CP 50013, Zaragoza, Spain; ³Departamento de Anatomía Patológica, Hospital Lozano Blesa, CP50004, Zaragoza, Spain; ⁴Laboratoire d'Embryologie Moleculaire, Institut Pasteur, 25-28 rue du Dr. Roux, 75724, Paris Cedex 15, France

Abstract. The non-toxic C fragment of tetanus toxin fused to the β -galactosidase enzyme was analysed as a neuroanatomical tracer. After intramuscular injection in rat tongue, its location in the hypoglossal network was compared with other classic tracers such as neurotropic viruses. The hybrid protein reached second and higher-order neurons after crossing several synapses. It appears to be a powerful tool to map neuronal circuits since the protein is easy to handle and detect and its transsynaptic transport is potential activity-dependent.

The correspondence should be addressed to: R. Osta, E-mail: osta@posta.unizar.es

Key words: tetanus toxin, C fragment of tetanus toxin, TTC, β -galactosidase, neuroanatomical tracer, hypoglossal nucleus

INTRODUCTION

Tracing neuronal connections has been a challenge in neuroanatomy, with profound implications both in the study of neural function and in the developmental and adult plasticity of the nervous system (Vercelli et al. 2000). Several anterograde and retrograde tracers have been used to provide a more detailed resolution of neuronal circuitry but with mixed results (Kobbert et al. 2000, Vercelli et al. 2000). The “ideal” tracer should allow easy, fast and stable detection, just-retrograde or anterograde transport, allow to label long circuits, provide specificity in neuronal network labeling and be safe to handle and harmless for animals. Finally, it would be an advantage to combine tracing protocols and neurophysiological paradigms (Lanciego and Wouterlood 2000).

Tetanus toxin is a potent neurotoxin produced by *Clostridium tetani*. Tetanus toxin prevents the release of inhibitory neurotransmitters from spinal cord interneurons by a specific mechanism of cell intoxication (for review, see: Schiavo et al. 2000). The pathological mechanism has been shown to involve retro-axonal and transsynaptic transport of the tetanus toxin. The transsynaptic movement of tetanus toxin was first demonstrated by autoradiographic localization in spinal cord interneurons after injection in muscle (Schwab and Thoenen 1976). However, previous studies of transsynaptic passage of tetanus toxin from motoneurons were limited by the rapid development of clinical tetanus and the death of the experimental animal (Price et al. 1977, Schwab and Thoenen 1976, Schwab and Thoenen 1977). The nontoxic proteolytic C fragment of tetanus (TTC peptide) is responsible for binding and internalization of the tetanus toxin into neurons (Ginalski et al. 2000, Halpern and Neale 1995, Herreros et al. 2000, 2001). This fragment has the same ability as the native toxin to bind nerve cells and be retrogradely transported through a synapse, but without causing clinical symptoms (Bizzini et al. 1977, Fishman and Carrigan 1987). For this reason, TTC has been used in several studies as a neuronal tracer (Cabot et al. 1991, Evinger and Erichsen 1986, Horn and Buttner-Ennever 1990, Meckler et al. 1990). However, it has limitations since TTC is diluted at each synapse, which makes antibody detection difficult. In order to solve this problem, other groups have amplified the signal using the β -galactosidase enzyme as a marker that is genetically fused to the TTC (Coen et al. 1997).

Another interesting characteristic of TTC is that its uptake at the neuromuscular junction depends on neuronal activity (Miana-Mena et al. 2002). A similar process may occur at the synaptic cleft, making TTC a very interesting tracer of active circuits to the CNS.

In this report, β -galactosidase-TTC (β -gal-TTC) hybrid protein was used as a retrograde neuroanatomical tracer to try to map the complex interconnections of the central nervous system (CNS). The behavior of β -gal-TTC was analysed in the known hypoglossal network of the rat, where it was able to cross several synapses. The results are compared with previous patterns obtained by injection of different neurotrophic viruses. Technical aspects of the application, uptake mechanisms, intracellular transport of the molecule and the problems of subsequent signal detection are also discussed.

METHODS

Protein injection

All experiments were carried out in accordance with European Community guidelines for laboratory animal handling. Twenty Wistar six-week-old rats were obtained from Iffa Credo Laboratories. Animals were anaesthetised for 10 minutes by halothane inhalation and were given an intramuscular injection (in the tongue) of β -galactosidase-TTC recombinant hybrid protein (30 μ l, 1 μ g/ μ l), obtained and purified as in Coen et al. (1997).

X-Gal and Immunohistology

After survival times of 2, 6, 12, 24 or 48 hours, the animals were deeply anaesthetised (pentobarbital 75 mg/kg). Then they were perfused *via* intracardiac with 75 ml of PBS and afterwards with 75 ml of 4% paraformaldehyde in PBS for fixation. Fixed brains were removed and rinsed in PBS before being frozen and cryosectioned into 20 μ m-thick slices for X-Gal staining or immunohistological methods.

In X-Gal staining, slices were incubated in X-Gal solution (4 mM $K_3(FeCN)_6$, 4 mM $(CN)_6FeK_4 \cdot 3H_2O$, 8 mg/ml X-Gal and 2 mM $MgCl_2$) at 37°C overnight and counter-stained for 5 minutes in Fast Nuclear Red.

In the immunohistological methods, slices were incubated in a 1:5,000 dilution of anti-TTC antibody as described by Coen et al. (1997). Antibodies were detected

using the Vectastain ABC alkaline phosphatase kit with diaminobenzidine color development. Slices were counter-stained for 5 minutes in Emerald Green.

After light microscopy analysis, labeled structures were identified in relation to the nuclei as defined in the atlas of the rat brain (Paxinos and Watson 1986).

Electron Microscopy

The removed fixed brain was cut into 150 μm vibratome sections and incubated in X-Gal solution. The X-Gal precipitate is electron dense and can be detected by direct examination (Bonnerot et al. 1987). Selected sections were post-fixed in 2.5% glutaraldehyde in PBS for 6 hours, rinsed with PBS for 10 minutes, and reacted with 1% osmium tetroxide in water for 30 minutes and subsequently with 1% uranyl acetate in water for 1 hour. Sections were dehydrated in increasing series of acetone and then embedded in Epon at 60°C for 48 hours, cut in 50 nm ultra-thin sections and examined with a Zeiss transmission electron microscope. The ultra-structural studies were performed on ten CD1 mice.

RESULTS

After intramuscular injection in the rat tongue, the distribution of β -gal-TTC protein in the CNS (Fig. 1) was analysed by X-Gal staining at several post-injection times (2, 6, 12, 24 and 48 hours). The retrograde transneuronal transport of β -gal-TTC was time dependent (Table I; Fig. 3) and observed in all animals, with a minimal variability.

At 2 hours post-injection, hypoglossal motoneurons (XIIMNs) and hypoglossal nerve (XIIn) labeling were easily found but relatively weak and only involved a few motoneurons. No other stained structure was detected in the CNS at this time, implying a lack of transsynaptic passage.

At 6 hours post-injection, both cell bodies of the XIIMNs and the closest part of their dendrites were very densely stained. The distribution of the second and third order transneuronally labeled cells in various regions of the brain was clearly defined and reproducible in all animals. Labeling appeared granular and confined to the soma of neuronal cell bodies in XIIMNs and transneuronally labeled neurons, while the cell nuclei were never labeled. The granular appearance is a result of the distribution of the β -gal-TTC protein in the endoplasmic reticulum membrane around the nucleus,

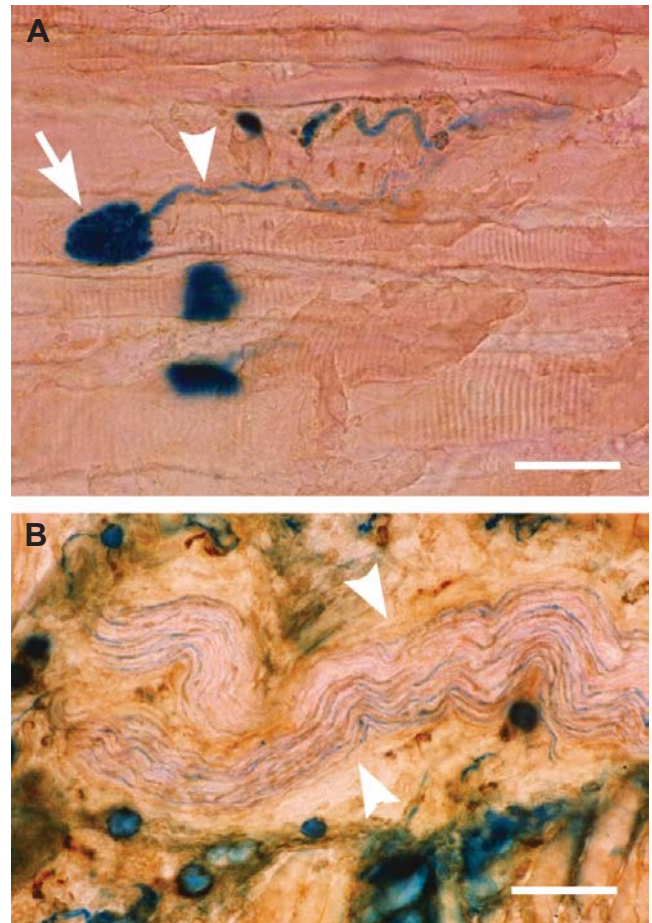


Fig. 1. β -galactosidase-TTC labeling in the tongue. A, tracer entering into the neuromuscular junction (arrow). Also observe an X-Gal labeled axon (arrowhead) (bar-50 μm). B, X-Gal labeling in axons of a nerve in the tongue (arrowheads) (bar-5 μm).

as shown by electron microscopy (Fig. 2). Sometimes the axon and parts of the dendrites closest to neuronal bodies could be visualised after β -galactosidase labeling (Fig. 2).

Second-order labeled neurons (which connected with the XIIMNs) were found in several regions of the brain (Table I, Fig. 2). First, we examined structures surrounding XIIMNs as oral motor nuclei. The labeling was dense in the motor trigeminal nucleus (MoV); while other oral structures, the facial nucleus (VII) (Fig. 2) and its descending facial nerve (VIIIn), and the adjoining accessory facial nucleus (AcsVII) were more lightly labeled.

As expected, strongly labeled neurons were also present in the parvocellular reticular nucleus (PCRt). The PCRt is located among the XIIMNs, MoV and VII. Most of the afferent projections to these motor oral nu-

Table I

Labeling of different cell types in the CNS after β -gal-TTC injection in the tongue.					
	2 h	6 h	12 h	24 h	48 h
First-order neurons					
XIIMNs, Hypoglossal motoneurons	+/-	+++	+++	+/-	-
XIIIn, Hypoglossal Nerve	+/-	++	++	-	-
Second-order neurons					
MoV, Motor Trigeminal n.	-	++	+	+/-	-
VII, Facial n.	-	+	-	-	-
VIIIn, Facial Nerve	-	+	+/-	-	-
AcsVII, Accessory Facial n.	-	+/-	-	-	-
PCRt, Parvocellular Reticular n.	-	++	+	+/-	-
R, Caudal Raphe n.	-	+	+/-	+/-	-
CG, Mesencephalic Central Gray*	-	+	+/-	+/-	-
Sol, Solitary Tract n.	-	-	-	+/-	-
Putative third-order cell groups					
SC, Superior Colliculus	-	+	+/-	+/-	-
Cx, Cerebral Cortex	-	+	+	+/-	-
Gen, Geniculated n.	-	+	+	-	-
SN, Substantia Nigra	-	+/-	+/-	-	-
MeV, Mesencephalic Trigeminal n.	-	-	+	+/-	-
Mve, Medial Vestibular n.	-	-	-	+/-	-
Rn, Red Nucleus	-	-	-	+/-	-

(*)Second-order cell groups also containing third-order neurons. (-) No labeling. (+ to +++) Increasing density of labeling. (+/-) Only labeled in some cases or at very low density.

clei come from the brainstem reticular formation (Panneton and Martin 1979, Travers and Norgren 1983, Ugolini 1995a). Additionally, some neuronal cells were also labeled in the caudal raphe nuclei (R) and in the central grey nucleus (CG) placed in mesencephalon.

Several cell groups belonging to the third order were also labeled, such as the superior colliculus (SC) and geniculated nucleus (Gen) (with a relatively strong signal) and the substantia nigra (SN), which is related to the oral motor nuclei. These cells, although not directly connected to the XIIMNs, provide projections to XIIMNs connected cell groups. We emphasise that β -gal-TTC arrived to the cerebral cortex (Cx) 6 hours after injection (Fig. 2).

At 12 hours post-injection the spatial distribution of labeled neurons was similar to 6 hours (Table I). The labeling intensity in XIIMNs and XIIIn was also similar to 6 hours but decreased in second-order structures (e.g., MoV, VIIIn, PCRt, R and CG) and disappeared in VII

and AcsVII. In structures containing third-order neurons, the intensity of the signal was maintained in Cx, Gen and SN and declined in SC. The only new structure detected was the mesencephalic trigeminal nucleus (MeV), which contains third-order neurons related to the oral motor nuclei.

After 24 hours post-injection, labeling was very weak. The β -gal staining decreased substantially in the XIIMNs, was not detectable in other structures such as XIIIn, VIIIn, Gen and SN. The solitary tract nucleus (Sol) appeared as a new positive second-order structure, which projects a few axons to XIIMNs, MoV and VII. As shown in Table I, the number of positive third-order structures increased with time, although the intensity of the signal weakened. Thus, labeling was weak in SC, MeV and CX, as at 12 hours post-injection, but also in the medial vestibular nucleus (Mve) and the red nucleus (Rn).

After 48 hours post-injection no structures were labeled, not even the XIIMNs.

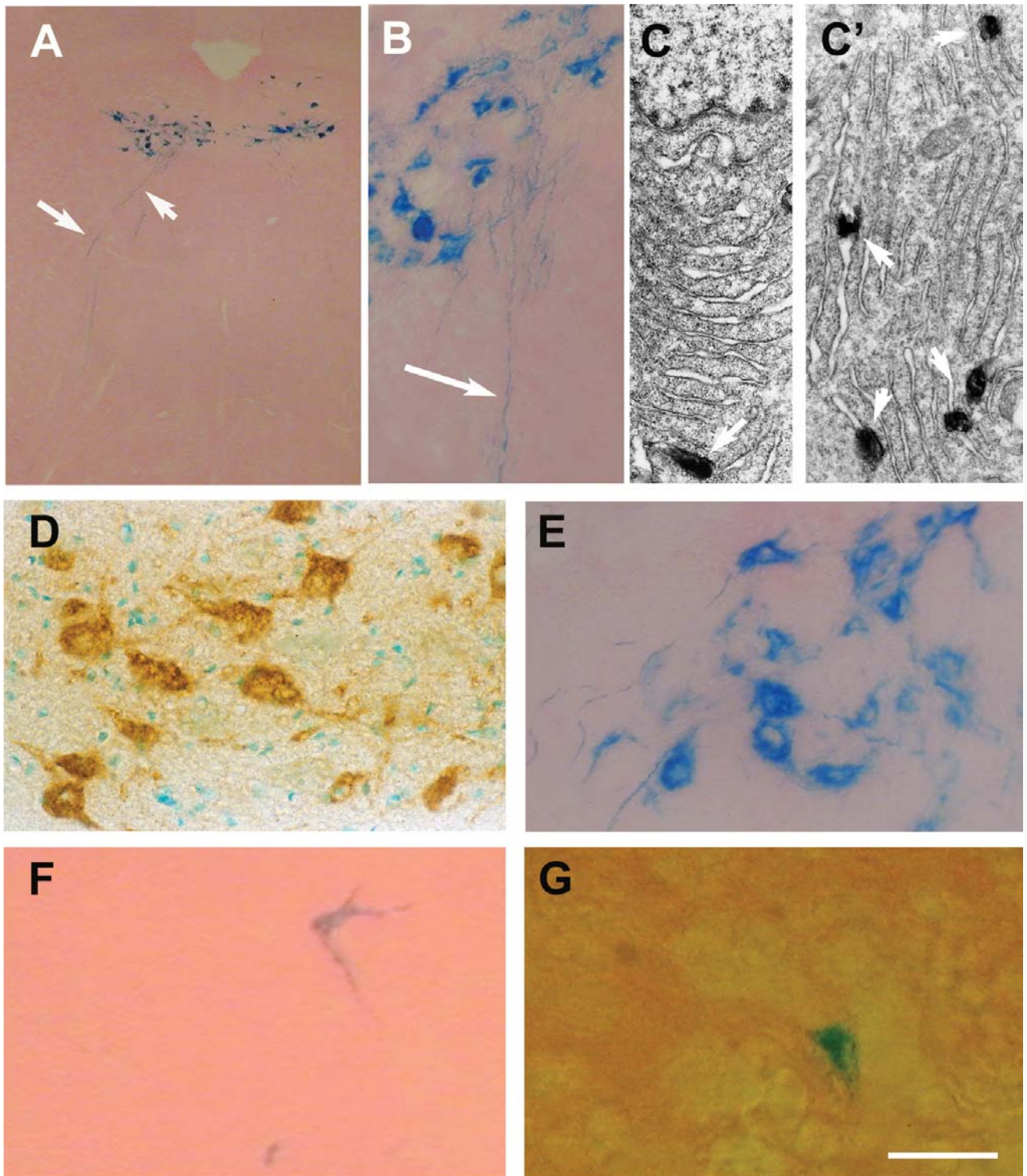


Fig. 2. A, β -galactosidase-TTC labeling in the hypoglossal nucleus. The arrows point to the hypoglossal nerve (bar-1mm); B, magnification of the hypoglossal nucleus and the axons of the hypoglossal nerve arriving to the motoneurons (arrow) (bar-0.5 mm); C and C', ultrastructural detail of the motoneuron body. Labeling was observed in the RER (bar-1 μ m); D, TTC was detected in the hypoglossal nucleus using anti-TTC antibodies (bar-20 μ m); E, β -galactosidase-TTC labeling of the trigeminal nucleus, related with the hypoglossal nucleus (bar-20 μ m); F, labeled motoneuron of the facial nucleus (bar-20 μ m); G, labeled motoneuron of motor cortex (bar-10 μ m).

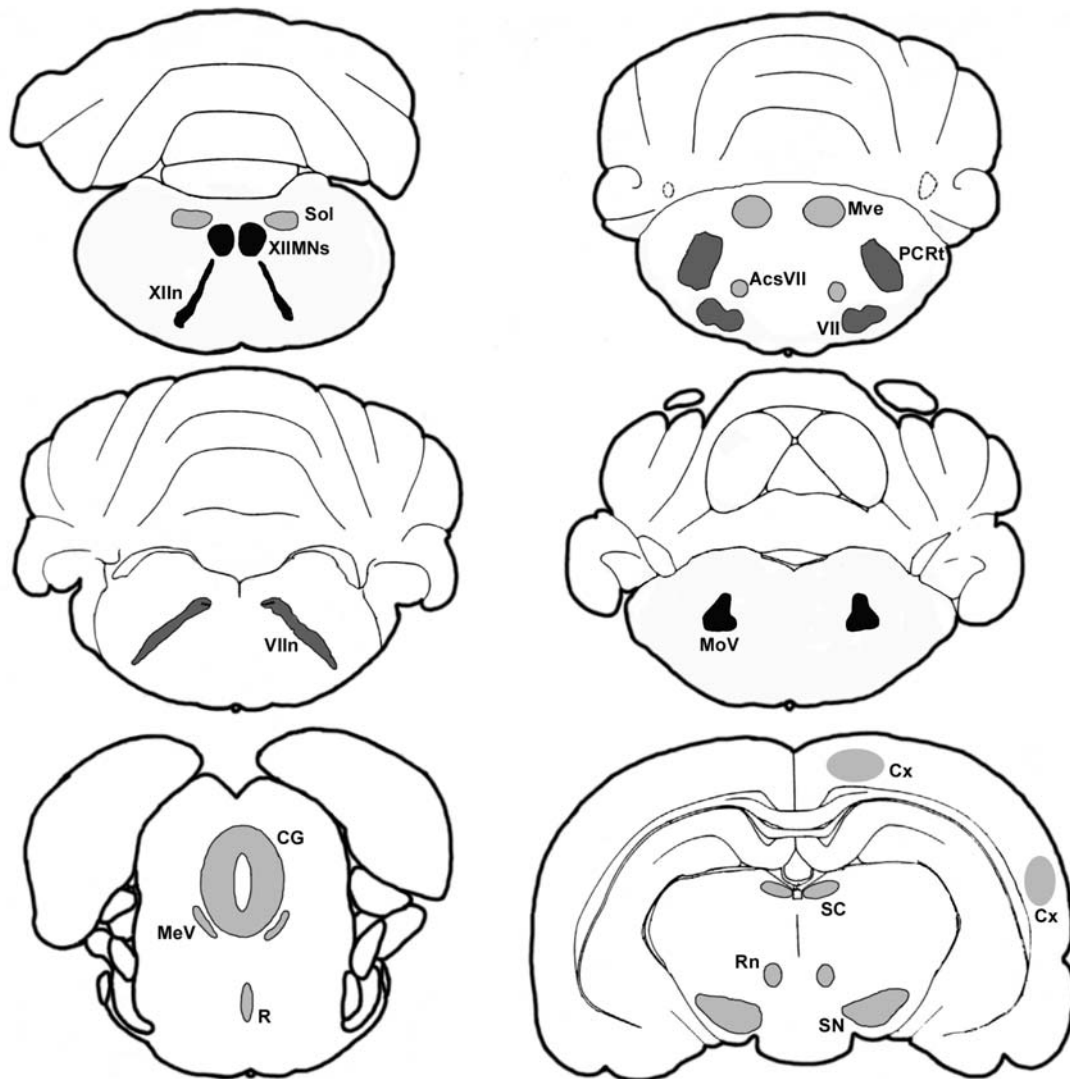


Fig. 3. Labeled structures in the brain. Oral motor nuclei (XIIMNs, MoV and VII) were labeled intensely. Third-order cell groups (MeV, SC, SN, Rn, R or Cx) were weakly labeled.

DISCUSSION

In this study we analysed the use of β -gal-TTC recombinant hybrid protein to map the neuronal circuits in the rat CNS. In spite of easy manipulation, it was difficult to detect due to the limitation of fragment C use. When a limited amount of protein is injected (such as TTC), only a fraction will be transported through a synapse and the signal will be diluted along the arborisation of the neuronal circuitry. This pitfall is partially solved by fusing the TTC to β -galactosidase (Coen et al. 1997). The signal is amplified by enzymatic activity, which produces a blue precipitate after joining the X-gal substrate. Moreover, the precipitate is electron-dense

(Bonnerot et al. 1987), which allows direct ultra-structural study by electron microscopy.

The spatial distribution of labeling in the CNS after β -gal-TTC protein injection was consistent with other studies using classic retrograde tracers such as germ agglutinin-horseradish peroxidase complex (Krammer et al. 1979, Panneton and Martin 1979, Travers and Norgren 1983) and transsynaptic neurotropic viruses, such as α -herpes (Ugolini 1995b) or the rhabdoviruses (Ugolini 1995a).

The granular shape of the labeling could have emerged because the migration of TTC inside the CNS is associated with the membranous compartments (Miana-Mena et al. 2002). Moreover, previous studies have shown that

the markers remaining in vesicles produce a granular appearance in the cell (Kobbert et al. 2000).

The extent of retrograde transport of hybrid protein in the hypoglossal circuit indicated that only a subset of interconnected neurons was detected, compared with neurotropic viruses. However, we could identify most areas containing second or higher-order of neurons using β -gal-TTC. This phenomenon could be explained by: a) unspecific labeling of the virus, b) β -gal-TTC protein dilution through the circuit, or c) β -gal-TTC activity dependent transport.

In the first case, the transneuronal pathway of neurotropic viruses has not yet been elucidated. Even some viruses (such as α -herpes) lyse the neuronal cell, allowing random release and non-specific uptake by other non-connected neurons close by, which could explain the wide distribution of these viruses in the CNS (Loewy 1995, Norgren and Lehman 1998). On the other hand, despite the presence of β -galactosidase enzyme, the signal was diluted through time along the arborisation of the neuronal circuitry, as the amount of injected protein was limited. Finally, the neuronal activity could influence protein transport. It has been shown that β -gal-TTC requires neuronal activity to be internalised and transported to the neuromuscular junction (Miana-Mena et al. 2002). This suggests that synaptic activity is required for transneuronal transport of β -gal-TTC in the CNS. Therefore, the hybrid protein would only detect active neuronal circuits (i.e., no labeling is found in the inferior olive, which is crossed by XIIIn but is not connected to the XIIMNs). The specificity of the activity could also explain why there are fewer structures labeled by β -gal-TTC than by neurotrophic viruses.

Currently, the most efficient transsynaptic method (in terms of the extent of transport and sensitivity of detection) involves neurotropic viruses (Kelly and Strick 2000, Kobbert et al. 2000, Norgren and Lehman 1998, Ugolini 1995a, Ugolini 1995b). These methods are very sensitive because each time a virus infects a new cell it replicates and amplifies the signal to help visualise higher order neurons in a chain. The disadvantage of viral methods is their potential toxicity. The development and institutionalisation of appropriate biosafety and animal care protocols are primary concerns when designing experiments with these neurotropic viruses (Kelly and Strick 2000). Even the relatively innocuous rabies virus (Ugolini 1995a), falls into the "continuous risk" category because it is often present in high concentrations can be contracted by bites or *via* aerosol (Kelly and

Strick 2000). The animals also often become increasingly ill after viral injection and die within one week (Norgren and Lehman 1998).

TTC is a non-toxic fragment of the tetanus toxin responsible for retrograde transsynaptic transport of the native molecule, without causing symptoms (Bizzini et al. 1977). However, some authors (Gill 1982) have pointed out that the presence of small quantities of intact tetanus toxin (that appear when TTC is obtained by papain digestion of the protein) could still produce tetanus, which would be a serious inconvenience. We have eluded this potential problem by using a recombinant β -gal-TTC molecule. It was obtained in the laboratory without the intact tetanus toxin and, as a result, none of the animals developed tetanus.

Finally, since most tracers are not electron dense, they are not very useful in ultrastructural analysis and require labour- and time-consuming post-staining processing (Lanciego and Wouterlood 2000). Fortunately, β -gal-TTC produces an electron-dense precipitate which can be detected directly by electron microscopy (Bonnerot et al. 1987).

CONCLUSION

In summary, we propose that the genetic fusion of the fragment C tetanus toxin and β -galactosidase enzyme could be a powerful retrograde tracer to analyse neuronal pathways after intramuscular injection. This method is not toxic and the transport and transsynaptic passage is quite fast. Moreover, since it can be detected directly by means of enzymatic activity, it can be used in electron microscopy studies. Finally, this method could also be used to map active neuronal networks since the transport may depend on neuronal activity.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by a grant from the Fondo de Investigacion Sanitaria (FIS-PI020840) and red CIEN. We thank María del Mar Arroyo and Luis Martín-Moreno for helpful comments.

REFERENCES

- Bizzini B., Stoeckel K., Schwab M. (1977) An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems. *J Neurochem* 28: 529-542.

- Bonnerot C., Rocancourt D., Briand P., Grimber G., Nicolas J.F. (1987) A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 6795-6799.
- Cabot J.B., Mennone A., Bogan N., Carroll J., Evinger C., Erichsen J.T. (1991) Retrograde, trans-synaptic and transneuronal transport of fragment C of tetanus toxin by sympathetic preganglionic neurons. *Neuroscience* 40: 805-23.
- Coen L., Osta R., Maury M., Brûlet P. (1997) Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 9400-9405.
- Evinger C., Erichsen J.T. (1986) Transsynaptic retrograde transport of fragment C of tetanus toxin demonstrated by immunohistochemical localization. *Brain Res* 380: 383-8.
- Fishman P.S., Carrigan D.R. (1987) Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin. *Brain Res* 406: 275-279.
- Gil D.M. (1982) Bacterial toxins: a table of lethal amounts. *Microbiol Rev* 46: 86-94.
- Ginalski K., Venclovas C., Lesyng B., Fidelis K. (2000) Structure-based sequence alignment for the beta-trefoil subdomain of the clostridial neurotoxin family provides residue level information about the putative ganglioside binding site. *FEBS Lett* 482: 119-124.
- Halpern J.L., Neale E.A. (1995) Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport. *Curr Top Microbiol Immunol* 195: 221-241
- Herreros J., Lalli G., Montecucco C., Schiavo G. (2000) Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem* 74: 1941-1950.
- Herreros J., Ng T., Schiavo G. (2001) Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* 12: 2947-2960.
- Horn A.K., Buttner-Ennever J.A. (1990) The time course of retrograde transsynaptic transport of tetanus toxin fragment C in the oculomotor system of the rabbit after injection into extraocular eye muscles. *Exp Brain Res* 81: 353-62.
- Kelly R.M., Strick P.L. (2000) Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system. *J Neurosci Methods* 103: 63-71.
- Kobbert C., Apps R., Bechmann I., Lanciego J. L., Mey J., Thanos, S. (2000) Current concepts in neuroanatomical tracing. *Prog Neurobiol* 62: 327-351.
- Krammer E.B., Rath T., Lischka M.F. (1979) Somatotopic organization of the hypoglossal nucleus: a HRP study in the rat. *Brain Res* 170: 533-537.
- Lanciego J.L., Wouterlood F.G. (2000) Neuroanatomical tract-tracing methods beyond 2000: what's now and next. *J Neurosci Methods* 103: 1-2
- Loewy A.D. (1995) Pseudorabies virus: A transneuronal tracer for neuroanatomical studies. In: *Viral vectors. Gene therapy and neuroscience applications.* (Eds. M.G. Kaplitt and A.D. Loewy), Academic Press, San Diego, CA, p. 349-66
- Meckler R.L., Baron R., McLachlan E.M. (1990) Selective uptake of C-fragment of tetanus toxin by sympathetic preganglionic nerve terminals. *Neuroscience* 36: 823-9.
- Miana-Mena F.J., Roux S., Benichou J.C., Osta R., Brûlet P. (2002) Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99: 3234-3239.
- Norgren, R.B. Jr., Lehman M.N. (1998) Herpes simplex virus as a transneuronal tracer. *Neurosci Biobehav Rev* 22: 695-708.
- Panneton W.M., Martin G.F. (1979) Midbrain projections to the trigeminal, facial and hypoglossal nuclei in the opossum. A study using axonal transport techniques. *Brain Res* 168: 493-511.
- Paxinos G., Watson C. (1986) *The rat brain in stereotaxic coordinates.* Academic Press, San Diego, CA.
- Price D.L., Griffin J., Peck K. (1977) Tetanus toxin: evidence of binding at presynaptic nerve endings. *Brain Res* 121: 379-384
- Schiavo G., Matteoli M., Montecucco C. (2000). Neurotoxins affecting neuroexocytosis. *Physiol Rev* 80: 717-766.
- Schwab M., Thoenen H. (1976) Electron microscopic evidence for a transsynaptic migration of tetanus toxin in spinal cord motoneurons: an autoradiographic and morphometric study. *Brain Res* 105: 213-227
- Schwab M., Thoenen H. (1977) Selective trans-synaptic migration of tetanus toxin after retrograde axonal transport peripheral sympathetic nerves: a comparison with nerve growth factor. *Brain Res* 122: 459-474
- Travers J.B., Norgren R. (1983) Afferent projections to the oral motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 220: 280-298.
- Ugolini G. (1995a) Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second- order and higher order central nervous system cell groups. *J Comp Neurol* 356: 457-480.
- Ugolini G. (1995b) Transneuronal tracing with alpha-herpesviruses: a review of the methodology. In: *Viral vectors. Gene therapy and neuroscience applications.* (Eds. M.G. Kaplitt and A.D. Loewy), Academic Press, New York, p. 293-317
- Vercelli A., Repici M., Garbossa D., Grimaldi A. (2000) Recent techniques for tracing pathways in the central nervous system of developing and adult mammals. *Brain Res Bull* 51: 11-28

A Non-Viral Vector for Targeting Gene Therapy to Motoneurons in the CNS

Francisco J. Miana-Mena^a María J. Muñoz^b Sylvie Roux^c Jesús Ciriza^a
Pilar Zaragoza^a Philippe Brûlet^c Rosario Osta^a

^aLaboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, y

^bDepartamento de Farmacología y Fisiología, Facultad de Veterinaria de Zaragoza, Zaragoza, España;

^cUnité d'Embryologie Moléculaire, Institut Pasteur, Paris, France

Key Words

Gene therapy · Naked DNA · Tetanus toxin,
C fragment · Pattern expression · Retrograde transport ·
Transsynaptic transport

Abstract

Gene therapy vectors that can be targeted to motoneuronal cells are required in the field of neurodegenerative diseases. We propose the use of the atoxic fragment C of tetanus toxin (TTC) as biological activity carrier to the motoneurons. Naked DNA encoding β -galactosidase-TTC hybrid protein was used to transfect muscle cells *in vivo*, resulting in a selective gene transfer of the enzymatic activity to the CNS. In the muscle, level expression of β -galactosidase was readily detectable 24 h after injection, reaching a maximum after 4 days and gradually decreasing thereafter. Labelling in the hypoglossal motoneurons and motor cortex was observed from 4 days after injection. In this paper, we show that TTC works as an enzymatic activity carrier to the CNS when muscle cells are transfected *in vivo*. We have also shown that the presence of TTC does not have any influence on the expression of the transfected gene. Both these results warrant further studies of TTC as a means of treating motoneuron diseases in the field of gene therapy.

Copyright © 2004 S. Karger AG, Basel

Introduction

Motoneuron diseases such as spinal muscular atrophy and amyotrophic lateral sclerosis are characterized by varying degrees of motoneuron degeneration. This results in progressive muscular atrophy and paralysis, leading invariably to death in amyotrophic lateral sclerosis and in most forms of spinal muscular atrophy. Various proteins such as neurotrophic factors, anti-apoptotic agents or anti-oxidants have been identified as potential therapeutic agents. Thus, neurotrophic factors (GDNF, BDNF, NT3, etc.) used *in vitro* have been shown to improve the motoneuron survival [1]. In clinical trials, the neurotrophins act on neurons affected by other neurological and psychiatric pathologies [2]. Gene transfer has been explored *in vivo* to deliver the enzymatic activities to the brain using adenoviral, lentiviral or adeno-associated viral vectors, which are efficient in transducing cells [3–6]. However, non-viral delivery systems are an attractive alternative due to safety concerns regarding the use of viruses in humans.

The atoxic C-terminal fragment of tetanus toxin or TTC retains the properties of the holotoxin [7]. TTC is necessary (and sufficient) for neuron binding, internalization, retrograde and transsynaptic transport [8, 9]. Moreover, studies both *in vitro* and *in vivo* have shown that

KARGER

Fax +41 61 306 12 34
E-Mail karger@karger.ch
www.karger.com

© 2004 S. Karger AG, Basel
1660–2854/04/0013–0101\$21.00/0

Accessible online at:
www.karger.com/ndd

Dr. Rosario Osta Pinzolas
Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos
Facultad de Veterinaria de Zaragoza, C/Miguel Servet 177
ES–50013 Zaragoza (Spain)
Tel. +34 976 76 16 20, Fax +34 976 76 16 12, E-Mail osta@posta.unizar.es

TTC has the capacity to deliver other large proteins linked by chemical or genetic fusion, such as horseradish peroxidase [10], β -galactosidase [11], superoxide dismutase [12–14] and cardiotrophin 1 [15] into neurons. For this reason, TTC is considered to be a promising alternative to invasive viral gene systems for delivering biological activity to the CNS. In these studies, all fusion proteins were administered *in vivo* via an intramuscular injection, after their production in prokaryote vectors. An alternative to a direct protein injection would be to induce protein production within the muscle, by naked DNA administration. This method has previously been used in *Xenopus* [16], where retrograde transport to the neural soma of a TTC fusion protein has been demonstrated.

In this paper, we show that this method also works in mammals, where both retrograde and transsynaptic TTC transport is evident. Furthermore, expression of the reporter gene (β -galactosidase enzyme) does not appear to be modified by the presence of the TTC protein.

These studies show the considerable potential of using the TTC to treat motoneuron diseases by gene therapy.

Material and Methods

Plasmid DNA Constructions

The different plasmid DNAs utilized in these studies contained an enhancer for the cytomegalovirus (CMV) promoter and the β -galactosidase reporter gene. pCMV- β -gal-TTC and pCMV- β -gal have been previously described [16]. β pCMV-NLS- β -gal (gift of A. Chouliska, Institut Pasteur) contains a nuclear localization signal.

Plasmids were propagated and purified using Endofree Plasmid Maxi Kits (Qiagen) and resuspended in Tris-EDTA endotoxin-free solution.

Animals and Intramuscular Injections of Plasmid DNA

All experiments complied with European laws for the protection of experimental animals.

98 six-week-old Wistar rats and 10 six-week-old CD1 mice obtained from Iffa Credo and Charles River, respectively, were used in these studies. Animals were anaesthetized with pentobarbital (200 mg/kg). The intramuscular injection of plasmid DNA or Tris-EDTA alone was performed in the tongue using an insulin syringe (Becton Dickinson). Due to the different sizes of the plasmids, a correction factor was applied to administer a similar copy number in each case. 15, 15 and 18 rats were injected with low doses which corresponded to 100 μ g/100 μ l for pCMV-NLS- β -gal and pCMV- β -gal plasmids and 130 μ g/100 μ l for pCMV- β -gal-TTC. Otherwise 15, 15 and 29 rats were injected, respectively, with the high dose 300 μ g/300 μ l for pCMV-NLS- β -gal and pCMV- β -gal plasmid and 390 μ g/300 μ l for pCMV- β -gal-TTC.

Intracardiac perfusion with PBS and 4% paraformaldehyde in PBS at 4°C under deep anaesthesia was performed. Tongue and brain from injected animals were removed 1, 4, 7, 15, 30 or 60 days after injection.

We found that at pH 7.6 endogenous β -galactosidase activity was not observed so all the following experiments were performed using this working value for the pH. Note that this pH value is not inconsistent with previous studies [17, 18], as the perfusion and detection conditions are slightly different in our case.

Histological Analyses

For *in toto* β -galactosidase activity detection, the X-Gal reaction was performed as previously described [11]. At this level, endogenous β -galactosidase does not react, as described before [14–16]. For histological analyses, dissected tissues that had been incubated overnight in 15% sucrose at 4°C were cut (20 μ m) with a cryostat. Sections were stained as described above and counterstained with fast nuclear red. For immunohistology with TTC antibody, sections were processed as described [16].

Electron Microscopy Analyses

For electron microscopy, 10 six-week-old CD1 mice were used. 3, 3 and 4 animals were injected with 20 μ g/20 μ l for pCMV-NLS- β -gal and pCMV- β -gal plasmids and 26 μ g/26 μ l for pCMV- β -gal-TTC. The muscle removed was cut into 150- μ m vibratome sections and incubated in X-Gal solution. The X-Gal precipitate is electron dense and can be detected by direct examination as described [19]. X-Gal-positive sections were thus treated for electron microscopy and embedded in Epon resin. Ultrathin sections were examined with a Zeiss transmission electron microscope.

Statistical Analyses

The statistical analyses of β -galactosidase transgene expression in muscle cells in 107 rats were mainly based on the three-way factorial analyses of variance (ANOVA). In order to carry out a deeper analysis of the different factors influencing plasmid expression, several Student t tests with a standard statistical threshold of 5% were performed. All statistical calculations were carried out using the Statistica version 5.0 program.

Results

β -gal-TTC Migration to the CNS

As described in the following section, β -galactosidase activity in the muscle was detected after injection, regardless of the administered plasmid construction (pCMV- β -gal-TTC, pCMV- β -gal or pCMV-NLS- β -gal) or its dose. As a negative control, animals were injected with different volumes of Tris-EDTA buffer and analysed throughout the course of time. No X-Gal staining was observed in non-DNA-injected muscles, which demonstrated the specificity of labelling.

Histological studies showed that in all cases the β -gal-TTC protein had a uniform distribution in the cytoplasm of transfected fibres (fig. 1a–c). The first evidence that the β -gal-TTC hybrid protein was released from transfected muscular fibres was obtained by light microscopy. The X-Gal precipitate was detected from the first day of the time course, having a uniform distribution in the transfected

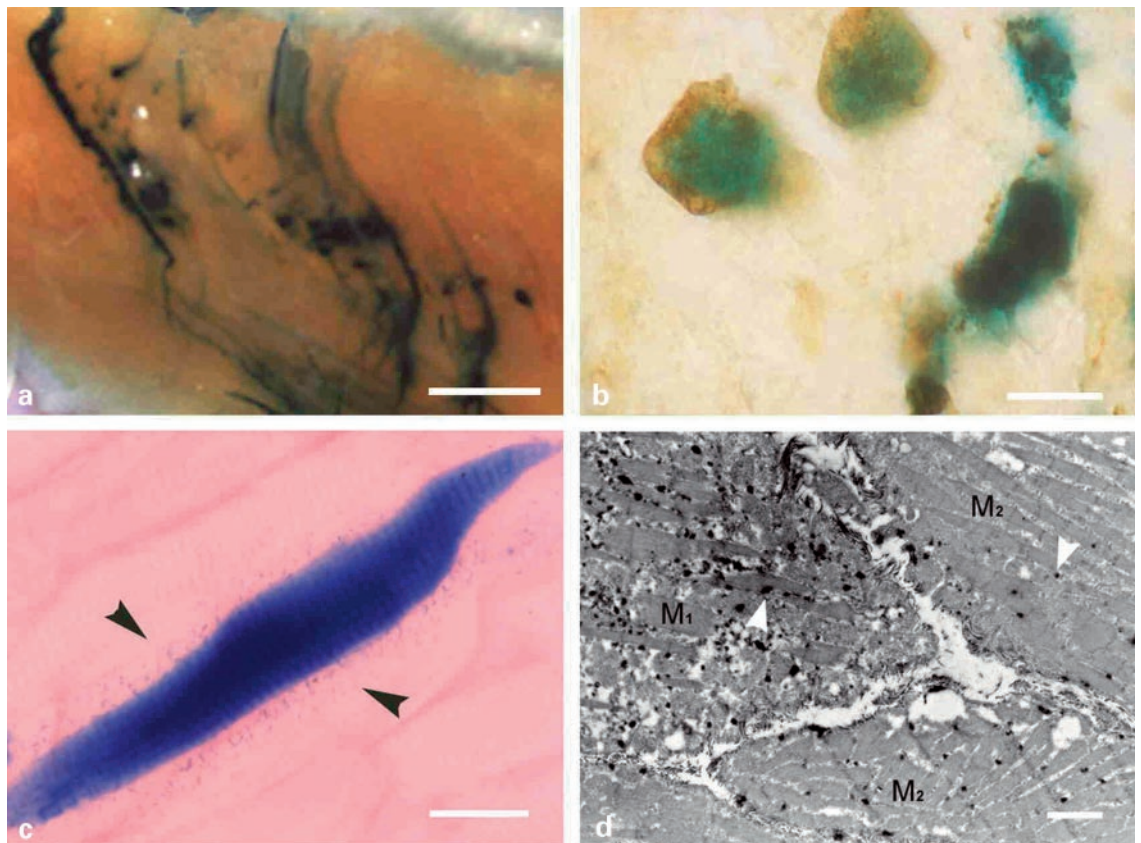


Fig. 1. Expression and interfibrillar passage of the β -gal-TTC hybrid protein after a naked DNA injection. **a** Muscular fibres showed β -galactosidase activity in a tongue injected with pCMV- β -gal-TTC construction 4 days after injection. Bar = 1 mm. **b** Representative examples of muscle fibres in cross-sections from animals injected with the CMV- β -gal-TTC plasmid. The sections were histochemically stained for β -galactosidase expression and then immunostained for TTC (rabbit anti-TTC antibodies; dilution 1:1,000). Dark brown

TTC signal co-localization with blue-stained muscle fibres that have β -galactosidase activity demonstrates the complete expression of the β -gal-TTC hybrid protein. Bar = 10 μ m. **c** X-Gal staining on muscle sections indicated that β -galactosidase activity passes from the transfected fibre to the adjacent fibres (black arrowheads). Bar = 10 μ m. **d** High magnification of this passage with electron microscopy. M_1 = transfected fibre; M_2 = adjacent fibre. White arrowheads indicate the X-Gal precipitate. Bar = 1 μ m.

fibre and only after 4 days being found in the peripheral cytoplasm of adjacent fibres. This interfibrillar passage was clearly shown by electron microscopy (fig. 1d). On the contrary, no exit from transfected muscle cells was observed for the control construction pCMV- β -gal, which lacks the TTC fragment. Labelled axons were observed to emerge from those muscles injected with pCMV- β -gal-TTC, suggesting that the transfer of β -gal-TTC to the motoneuron had occurred from the expression site in the muscle (fig. 2a, b). These results indicate that the β -gal-TTC fusion protein has the capacity to migrate from the original fibre and enter into neighbouring fibres and axons.

Transport of the fusion protein was examined in more detail by analysing X-Gal-stained brain slices. In these studies, we concentrated on enzymatic detection, as labelling with anti- β -galactosidase or an anti-TTC antibody is less informative [14], because of the small amounts of protein delivered to the CNS. Despite the high levels of expression in the tongue, no β -galactosidase activity was detected in the brain 1 day after DNA administration. Four days after injection, weak labelling was observed bilaterally in the hypoglossal nucleus, which is directly responsible for tongue activity through the 12th nerve. The hybrid protein was located in the cytoplasm of the neuron with a perinuclear distribution (fig. 2c-g), as occurs when the β -gal-TTC is injected as protein.

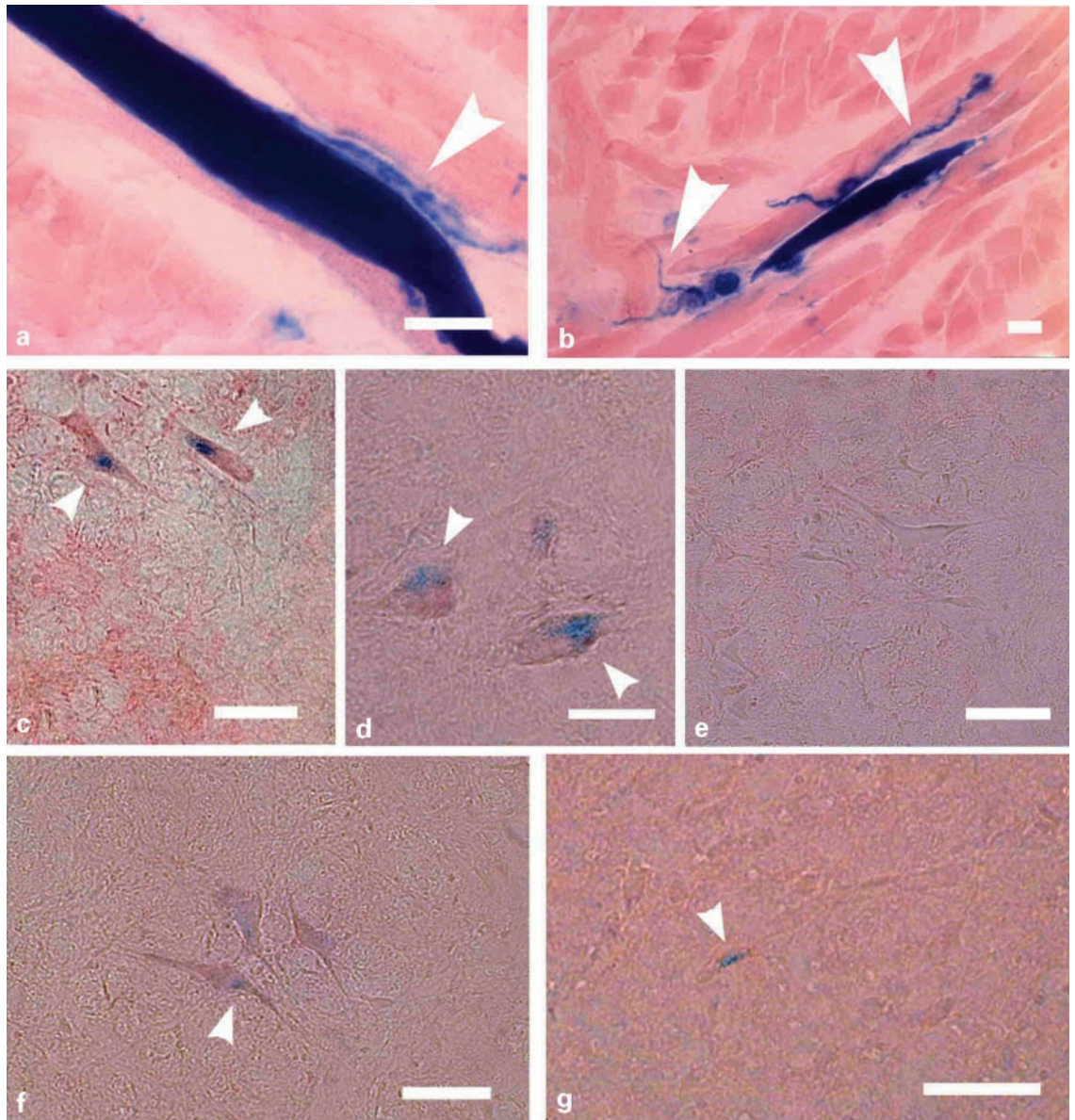


Fig. 2. Retrograde and transsynaptic transport of the β -gal-TTC hybrid protein. **a, b** X-Gal staining of sliced transfected muscle fibres with pCMV- β -gal-TTC shows labelling in putative motoneuron axon-like structures (white arrowheads) suggesting the transfer of the fusion protein into motoneurons from their expression site in the muscle. Bar = 10 μ m. **c-g** Transneuronal labelling observed 4 days after naked DNA injection: gigantocellular reticular nucleus (**c**), medial vestibular nucleus (**d**), control, i.e. gigantocellular reticular nucleus of non-injected animals (**e**), superior colliculus (**f**) and motor cortex (**g**). **c-g** Bar = 20 μ m.

With regard to the detection of retrograde transport, we found labelling in second-order interneurons, as well as synapsing in higher-order neurons with the hypoglossal motoneurons. In all pCMV- β -gal-TTC-injected animals, we detected transneuronal labelling in the superior colliculus, gigantocellular reticular nucleus, medial vestibular

nucleus and motor cortex (fig. 2). Due to the paucity of β -galactosidase-labelled axon-like profiles, one cannot exclude that these axons are labelled following a lesion due to the needle used for injection. This could invalidate the existence of a β -galactosidase transfer from the muscles to the neurons, but not from the first to the second neurons.

However, no labelled neurons were found in the CNS after Tris-EDTA or pCMV- β -gal injection. Therefore labelling in neurons is due to the presence of TTC in the fusion protein and not to the transport of plasmids along the axon or to the endogenous β -galactosidase. Visualization of transsynaptic transport was difficult 30 days after injection, probably due to reduced expression within transfected muscle cells, which is commonly found in many studies using naked DNA.

TTC transport is very specific, as fusion proteins are only found in muscle cells or neurons and not in other cell types. With respect to the possible toxicity caused by TTC encoded from a naked DNA injection, none of the transfected muscles appeared to have been damaged after analyses by optical microscopy. Moreover, no symptoms of tetanus were observed, even when proteins were synthesized by the muscles for 60 days.

Influence of TTC Presence on the Expression Pattern after Naked DNA Administration in the Rat Muscle

To determine the possible influence of the presence of TTC on the level expression of β -galactosidase in the muscle, pCMV- β -gal-TTC, pCMV-NLS- β -gal or pCMV- β -gal plasmid constructions were injected into the tongue in both low and high amounts, and the numbers of X-Gal-positive myofibres were counted under a dissecting microscope at different postinjection times.

A three-way factorial ANOVA was performed in order to determine the influence of the different plasmid constructions, including the administered dose and postinjection time. There were no significant differences between the number of fibres labelled by the 3 plasmids at different doses or postinjection times ($F = 0.008$, $p > 0.05$). Therefore, the presence of TTC does not modify the evolution time of expression levels. However, we found that the number of labelled fibres depends on both postinjection time and dose ($F = 6.634$, $p < 0.01$, and $F = 9.087$, $p < 0.01$, respectively). Also, an interaction between time and dose was detected ($F = 2.450$, $p < 0.05$), suggesting that the influence of the dose is not constant over time.

To further quantify the time evolution for the number of labelled fibres, Student's t test was applied (following the result previously described, the plasmid effect was not considered). A statistical analysis was performed separately for each dose, in order to take into account the time-dose interaction. According to time evolution of the number of labelled cells, we found that the results could be grouped into three periods consisting of: short term (comprising days 1–4), medium term (days 7–15) and long term (days 30–60). For a given dose, the number of

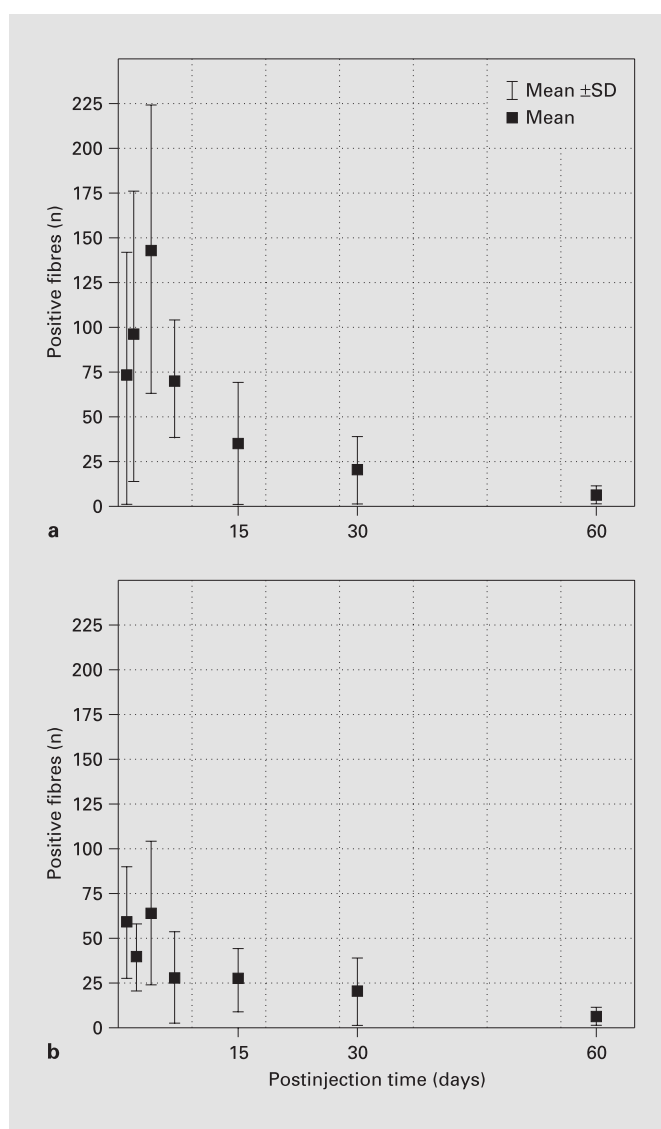


Fig. 3. pCMV- β -gal-TTC transgene expression in muscle cells. In both the high (**a**) and low (**b**) doses, the number of labelled fibres was higher in the short term (first 4 days) and then declined progressively to stabilize until the last observation (60 days). In the short and medium term, the level expression of β -galactosidase was dose dependent. The variability response was always higher in the short term to decline through time for both doses. However, in the case of the high doses (**a**), the initial expression level and variability were higher than for low doses (**b**). In this way, 24 h after injection, the expression level for high doses was 71.00 ± 27.96 and 59.37 ± 11.86 positive fibres. Despite this higher variability response to the high doses, positive fibres were always detected. Animals with no positive fibres were detected from day 4 with low administered doses and from day 30 with high injected doses. Mean and variability are only statistically comparable for both doses from day 30 (high dose: 16.00 ± 7.05 positive fibres; low dose: 20.33 ± 6.76 positive fibres).

labelled cells is different for different periods, but no significant differences were observed within the same period.

With respect to dose dependence, we found that the number of labelled cells is higher for the higher dose in both short and medium terms ($t = 2.43$, $p < 0.05$, and $t = 2.14$, $p < 0.05$, respectively) but is dose independent in the long term ($t = 0.38$, $p > 0.05$). More precisely, in the short term, the mean number of labelled positive fibres is approximately twice as high for higher doses (100.44 ± 35.68 fibres) than for lower doses (57.65 ± 14.54 fibres). However, level expression of β -galactosidase is not proportional to the administered quantity of DNA, which was 3 times higher for higher doses. High-dose transfection has an effectiveness of 0.33 positive fibres/ μg of injected DNA, approximately 70% lower than the low-dose one (0.58 fibres/ μg DNA). As shown in figure 3, the level expression of β -galactosidase difference between doses decreases in the medium term (28.38 ± 10.25 fibres in the low-dose case, 44.31 ± 24.04 fibres in the high-dose one) and is not statistically significant in the long term (12.09 ± 9.91 and 10.66 ± 8.6 for low and high doses, respectively).

The variability in responses was higher for high-dose administration than for low doses. In both cases, variability decreases with postinjection time (fig. 3). Similar results have been found in other studies and could be due to individual factors [20, 21].

Discussion

In these studies, we have demonstrated the transport of the muscle-produced β -gal-TTC protein to the CNS. When fused to TTC, injection of pCMV- β -gal-TTC into the muscles resulted in localization of the β -galactosidase protein in the motoneurons of the CNS. Furthermore, when naked DNA was injected into the tongue, the β -gal-TTC protein was only found in the hypoglossal network, which corresponds to retrograde and transsynaptic transport of the fusion protein. In this respect, the spatial pattern of the neurons labelled with muscle-produced β -gal-TTC is similar to that reported for other conventional tracers, such as the wheat germ agglutinin-horseradish peroxidase complex, neurotrophic viruses such as α -herpes [22], rhabdoviruses [23] and the TTC protein when directly injected [11]. With respect to the transport time, we found detectable accumulation of muscle-produced β -gal-TTC in hypoglossal motoneurons and second-order interneurons within 4 days after injection. This

is in contrast with similar studies undertaken in *Xenopus* where retrograde transport was observed to take at least 30 days after injection [16]. At this time, we cannot provide a complete explanation for this difference; however, a difference in the susceptibility of these animals to tetanus, different muscle activity and/or to different response times to the networks involved may account for the inter-species variability.

At this time, the mechanism by which TTC is secreted from the muscle cell and its uptake by neurons is not known. Although TTC lacks a secretion signal, numerous proteins are known to be secreted by cells while lacking a specific signal [24]. We could hypothesize that the fusion protein synthesized by the transfected muscle is guided and released directly into the synaptic cleft of the neuromuscular junction and then taken up by the motoneuron. TTC internalization into motoneurons has been studied previously, suggesting the role of a dual receptor model: an N-glycosylated 15-kD receptor protein with a neuro-specific expression [9] and gangliosides [25]. Both are present in lipid rafts, which are microdomains of the plasma membrane enriched in sphingolipids (including gangliosides), cholesterol and glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins [26, 27]. These lipid microdomains could be involved in the unconventional muscular secretion mechanism of β -gal-TTC [28]. The TTC passage across two neurons has already been described [11, 14, 15, 23], but the passage across muscle cells has not previously been reported. This, however, is in accordance with studies showing that TTC enters into muscle cells after a direct intramuscular injection of the protein [25]. Also note that lipid rafts are found in the muscle cells [29, 30] and thus could be responsible for the interfibrillary passage observed.

Another important property supporting TTC use in therapy is how it is transported along neurons. TTC fusion protein lacks the translocation domain of native tetanus toxin, which is presumably required for cytosolic entry of tetanus neurotoxin to the cytosol [31]. In this respect, β -gal-TTC protein injection studies have shown that the protein is never observed to be free in the lumen of vesicles or in the cytosol, its transport always being associated with membranes [32]. In the DNA injection study presented in this paper, the signal detected in the CNS was so weak that electron microscopy analyses of its subcellular location could not be performed. However, we expect the same transport mechanism in the CNS between directly injected and muscle-produced β -gal-TTC, given that, in both cases, β -gal-TTC enters the motoneuron already as a protein. The localization of TTC in the

membrane could be problematic in some possible therapeutic applications. However, there are substances that act, precisely, at the membrane, as with neurotrophic factors, which act on the receptor in the synaptic cleft membrane and not within the neuronal cytosol. It may be conjectured that the TTC fused to these substances would interact with the receptors in the transsynaptic passage (in the neuromuscular junction or in the central synapses).

With respect to the β -galactosidase level expression in the muscle cell, the fact that it is not influenced by the presence of TTC indicates that muscle-produced TTC is neither toxic to the muscle cell nor strongly antigenic. This is consistent with the fact that polypeptide or toxoid vaccines generated a higher response than DNA when fragment C was used on its own to control tetanus disease [33].

The evolution time of β -galactosidase level expression reported in this paper is in accordance with previous studies of shaving expression after β -galactosidase naked DNA injection into leg and arm muscles [20]. The origin of the temporal decrease in expression is not totally clear; it could be due to the Th1 (cytotoxic) immune response or to the presence of endogenous endonucleases, as previously postulated [20, 34]. In comparison to previous studies, we found that the number of labelled fibres is smaller for injections into the tongue muscle. This is not surprising, as muscle characteristics such as its connective tissue, spatial configuration and/or different fibre type distributions could be involved in expression levels [33].

The smaller transfection effectiveness obtained for high doses may be related to the reported decrease in transfection level when the injected volume increases [20]. In our study, the injected volume in the high-dose case was 3 times larger than in the low-dose case. In spite of this lower effectiveness of the high dose, we have only observed lack of expression before 30 days in low-dose-injected animals. Hence, a high amount of injected DNA

guarantees protein expression (although most of the DNA was degraded [21]), which could be important for gene therapy. It would be desirable to improve the transfer effectiveness and to decrease the variability; different strategies considered are electroporation and the combination of TTC with viral vectors [35, 36]. However, for some uses, a more effective transfer might not be strictly necessary: for instance, neurotrophic factors have been effective for motoneural survival at very low concentrations (from 40 pg/ml to 0.1 ng/ml) [37–39].

To summarize, direct injection of a single dose of β -gal-TTC plasmid DNA into rat tongue muscle results in the uptake of encoded β -gal-TTC protein by the hypoglossal motoneurons and their connections. β -gal-TTC proteins are already found in the CNS 4 days after injection, and their presence is detectable for at least 60 days. Additionally, we have shown that the presence of TTC does not have any influence on the expression of the transfected gene. The presence of TTC in the CNS and the lack of nervous (or other) symptoms, even 60 days after injection, strongly suggests that muscle-produced β -gal-TTC is not toxic to the animal. Based on these results, we propose a gene therapy approach based on different TTC fusion proteins, which could help deliver a biological function to the CNS. We believe that this is an interesting method as a therapeutic strategy for degenerative motoneuron diseases, and further studies are therefore warranted to investigate the potential of these fusion proteins to use in protocols of human gene therapy.

Acknowledgements

We wish to thank Mamen Morillo and José Ignacio Rivera for their technical support, also Luis Martin Moreno and Kelly Rogers for their suggestions and finally Gema Yagüe for her help with the statistical analyses. This work was supported by a grant from the Fondo de Investigacion Sanitaria (PI020840) and Red CIEN.

References

- 1 Lin LF, Zhang TJ, Collins F, Armes LG: Purification and initial characterization of rat B49 glial cell line-derived neurotrophic factor. *J Neurochem* 1994;63:758–768.
- 2 Miller RG, Petajan JH, Bryan WW, Armon C, Barohn RJ, Goodpasture JC, Hoagland RJ, Parry GJ, Ross MA, Stromatt SC: A placebo-controlled trial of recombinant human ciliary neurotrophic (rhCNTF) factor in amyotrophic lateral sclerosis. rhCNTF ALS Study Group. *Ann Neurol* 1996;39:256–260.
- 3 Acsadi G, Anguelov RA, Yang H, Toth G, Thomas R, Jani A, Wang Y, Ianakova E, Mohammad S, Lewis RA, Shy ME: Increased survival and function of SOD1 mice after glial cell-derived neurotrophic factor gene therapy. *Hum Gene Ther* 2002;13:1047–1059.
- 4 Millicamps S, Mallet J, Barkats M: Adenoviral retrograde gene transfer in motoneurons is greatly enhanced by prior intramuscular inoculation with botulinum toxin. *Hum Gene Ther* 2002;13:225–232.
- 5 Lu YY, Wang LJ, Muramatsu S, Ikeguchi K, Fujimoto K, Okada T, Mizukami H, Matsushita T, Hanazono Y, Kume A, Nagatsu T, Ozawa K, Nakano I: Intramuscular injection of AAV-GDNF results in sustained expression of transgenic GDNF, and its delivery to spinal motoneurons by retrograde transport. *Neurosci Res* 2003;45:33–40.

- 6 Cisterni C, Henderson CE, Aebischer P, Pettmann B, Deglon N: Efficient gene transfer and expression of biologically active glial cell line-derived neurotrophic factor in rat motoneurons transduced with lentiviral vectors. *J Neurochem* 2000;74:1820–1828.
- 7 Halpern JL, Habig WH, Neale EA, Stibitz S: Cloning and expression of functional fragment C of tetanus toxin. *Infect Immun* 1990;58:1004–1009.
- 8 Goldberg RL, Costa T, Habig WH, Kohn LD, Hardegree MC: Characterization of fragment C and tetanus toxin binding to rat brain membranes. *Mol Pharmacol* 1981;20:565–570.
- 9 Herreros J, Lalli G, Montecucco C, Schiavo G: Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons. *J Neurochem* 2000;74:1941–1950.
- 10 Fishman PS, Savitt JM: Transsynaptic transfer of retrogradely transported tetanus protein-peroxidase conjugates. *Exp Neurol* 1989;106:197–203.
- 11 Coen L, Osta R, Maury M, Brulet P: Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transsynaptically into the central nervous system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1997;94:9400–9405.
- 12 Matthews CC, et al: Protective effect of supplemental superoxide dismutase on survival of neuronal cells during starvation: Requirement for cytosolic distribution. *J Mol Neurosci* 2000;14:155–166.
- 13 Figueiredo DM, et al: Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport. *Exp Neurol* 1997;145:546–554.
- 14 Francis JW, Hosler BA, Brown RH Jr, Fishman PS: CuZn superoxide dismutase (SOD-1): Tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells. *J Biol Chem* 1995;270:15434–15442.
- 15 Bordet T, Castelnau-Ptakhine L, Fauchereau F, Friocourt G, Kahn A, Haase G: Neuronal targeting of cardiotrophin-1 by coupling with tetanus toxin C fragment. *Mol Cell Neurosci* 2001;17:842–854.
- 16 Coen L, Kissa K, le Mevel S, Brulet P, Demeineix BA: A somatic gene transfer approach using recombinant fusion proteins to map muscle-motoneuron projections in *Xenopus* spinal cord. *Int J Dev Biol* 1999;43:823–830.
- 17 Rosenberg WS, Breakefield XO, DeAntonio C, Isacson O: Authentic and artifactual detection of the *E. coli* lacZ gene product in the rat brain by histochemical methods. *Brain Res Mol Brain Res* 1992;16:311–315.
- 18 Weiss DJ, Liggitt D, Clark JG: Histochemical discrimination of endogenous mammalian beta-galactosidase activity from that resulting from lac-Z gene expression. *Histochem J* 1999;31:231–236.
- 19 Bonnerot C, Rocancourt D, Briand P, Grimber G, Nicolas JF: A beta-galactosidase hybrid protein targeted to nuclei as a marker for developmental studies. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987;84:6795–6799.
- 20 Doh SG, Vahlsing HL, Hartikka J, Liang X, Manthorpe M: Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of lacZ plasmid DNA. *Gene Ther* 1997;4:648–663.
- 21 Barry ME, Pinto-Gonzalez D, Orson FM, McKenzie GJ, Petry GR, Barry MA: Role of endogenous endonucleases and tissue site in transfection and CpG-mediated immune activation after naked DNA injection. *Hum Gene Ther* 1999;10:2461–2480.
- 22 Ugolini G: Transneuronal tracing with alpha-herpesviruses: A review of the methodology; in Kaplitt MG, Loewy AD (eds): *Viral Vectors. Gene Therapy and Neuroscience Applications*. New York, Academic Press, 1995, pp 293–317.
- 23 Ugolini G: Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: Transfer from hypoglossal motoneurons to connected second-order and higher order central nervous system cell groups. *J Comp Neurol* 1995;356:457–480.
- 24 Prochiantz A: Homeodomain-derived peptides: In and out of the cells. *Ann NY Acad Sci* 1999;886:172–179.
- 25 Herreros J, Ng T, Schiavo G: Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons. *Mol Biol Cell* 2001;12:2947–2960.
- 26 Simons K, Gruenberg J: Jamming the endosomal system: Lipid rafts and lysosomal storage diseases. *Trends Cell Biol* 2000;10:459–462.
- 27 Brown DA, London E: Structure, and function of sphingolipid-, and cholesterol-rich membrane rafts. *J Biol Chem* 2000;275:17221–17224.
- 28 Simons K, Ikonen E: Functional rafts in cell membranes. *Nature* 1997;387:569–572.
- 29 Galbiati F, Razani B, Lisanti MP: Emerging themes in lipid rafts and caveolae. *Cell* 2001;106:403–411.
- 30 Kurzchalia TV, Parton RG: Membrane microdomains and caveolae. *Curr Opin Cell Biol* 1999;11:424–431.
- 31 Montecucco C, Schiavo G, Rossetto O: The mechanism of action of tetanus and botulinum neurotoxins. *Arch Toxicol Suppl* 1996;18:342–354.
- 32 Miana-Mena FJ, Roux S, Benichou JC, Osta R, Brulet P: Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:3234–3239.
- 33 Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA: Efficient expression of naked DNA delivered intra-arterially to limb muscles of nonhuman primates. *Hum Gene Ther* 2001;12:427–438.
- 34 Wells KE, et al: Immune responses, not promoter inactivation, are responsible for decreased long-term expression following plasmid gene transfer into skeletal muscle. *FEBS Lett* 1997;407:164–168.
- 35 Mir LM, et al: High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:4262–4267.
- 36 Mathiesen I: Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo. *Gene Ther* 1999;6:508–514.
- 37 Oppenheim RW, et al: Developing motor neurons rescued from programmed and axotomy-induced cell death by GDNF. *Nature* 1995;373:344–346.
- 38 Oppenheim RW, Prevette D, Yin QW, Collins F, MacDonald J: Control of embryonic motoneuron survival in vivo by ciliary neurotrophic factor. *Science* 1991;251:1616–1618.
- 39 Ma YT, Hsieh T, Forbes ME, Johnson JE, Frost DO: BDNF injected into the superior colliculus reduces developmental retinal ganglion cell death. *J Neurosci* 1998;18:2097–2107.

Neuronal activity-dependent membrane traffic at the neuromuscular junction

Francisco Javier Miana-Mena^{*†}, Sylvie Roux^{†*}, Jean-Claude Benichou[‡], Rosario Osta^{*}, and Philippe Brûlet^{*§}

^{*}Laboratorio de Genética Bioquímica y Grupos Sanguíneos, Departamento de Anatomía, Embriología y Genética Animal, Facultad de Veterinaria de la Universidad de Zaragoza, Calle de Miguel Servet, 177, 50013 Zaragoza, Spain; and [†]Unité d'Embryologie Moléculaire, URA 1947, Centre National de la Recherche Scientifique, Institut Pasteur, 25 Rue du Docteur Roux, 75724 Paris Cedex 15, France

Communicated by François Jacob, Institut Pasteur, Paris, France, January 14, 2001

During development and also in adulthood, synaptic connections are modulated by neuronal activity. To follow such modifications *in vivo*, new genetic tools are designed. The nontoxic C-terminal fragment of tetanus toxin (TTC) fused to a reporter gene such as *LacZ* retains the retrograde and transsynaptic transport abilities of the holotoxin itself. In this work, the hybrid protein is injected intramuscularly to analyze *in vivo* the mechanisms of intracellular and transneuronal traffics at the neuromuscular junction (NMJ). Traffic on both sides of the synapse are strongly dependent on presynaptic neural cell activity. In muscle, a directional membrane traffic concentrates β -galactosidase-TTC hybrid protein into the NMJ postsynaptic side. In neurons, the probe is sorted across the cell to dendrites and subsequently to an interconnected neuron. Such fusion protein, sensitive to presynaptic neuronal activity, would be extremely useful to analyze morphological changes and plasticity at the NMJ.

The precision with which neuronal circuits are assembled during development is critical in defining the behavioral repertoire of a mature organism. Analyzing brain functioning in normal and pathological conditions will require to integrate functional information onto anatomical data at a cellular and molecular level. To that goal, genetic tools are being constructed in parallel with improving performances in molecular imaging techniques. The atoxic C-terminal fragment of tetanus toxin (TTC) fused to a reporter gene such as *LacZ* can traffic retrogradely and transcellularly inside a restricted neural network. After injection into the tongue, the enzymatic activity could be detected in the hypoglossal nucleus and also in connected neurons of the brainstem areas (1). However, the molecular mechanisms involved in protein transfer between two synaptically connected cells are still unknown and should be investigated at several levels of integration. To explore the *in vivo* intracellular and transneuronal traffic molecular details at the neuromuscular junction (NMJ), we have chosen to inject the purified hybrid protein β -galactosidase (β -gal)-TTC intramuscularly and follow the transport details by confocal and electron microscopy. A high amount of tracer protein thus is made available locally to progress into endocytic itineraries. Visualization of spreading thus is facilitated in a simple neuromuscular system.

In this report, we show that β -gal-TTC allows selection and visualization of a specific membrane traffic, demonstrating *in vivo* the feasibility of tracing endocytic pathways at an NMJ. On both sides of the synapse, normal motoneuronal activity has strong effects on the probe intracellular distribution. In muscle, motoneuronal activity polarizes the membrane traffic to the active NMJ compartment. In neuron, the hybrid protein is sorted rapidly across the cell to dendrites and subsequently to an interconnected neuron, suggesting the existence of a retrograde intraneuronal feedback traffic.

Materials and Methods

***In Vivo* Intramuscular Injection.** All experiments were made in accordance with French and European Community guidelines

for laboratory animal handling. Six-week-old CD1 mice were obtained from Charles River Breeding Laboratories. Intramuscular injection of β -gal-TTC protein (25 μ l, 1 μ g/ μ l) purified as described (1) was given into the gastrocnemius or the tongue. Animals were killed 2 or 6 h after injection. β -Gal was administered systematically as a negative control. Under deep anesthesia, animals were perfused intracardially with 4% paraformaldehyde. Injected muscles and brains were removed and rinsed in PBS before 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside (X-Gal) *in toto* reaction or were frozen before cryosectioning into 20 μ m-thick slices for immunohistological analysis.

X-Gal Staining and Electron Microscopy. For *in toto* β -gal activity detection, tissues were washed three times for 5 min at 4°C with PBS and stained in X-Gal solution (0.8 mg/ml X-Gal/4 mM potassium ferricyanide/4 mM potassium ferrocyanide/4 mM MgCl₂ in PBS) at 37°C overnight. Electron microscopic analysis was performed by using X-Gal reaction with the electron-dense 5-bromo-4-chloro-3-indol precipitate. After X-Gal coloration, the cells were fixed further in 2.5% glutaraldehyde and processed as described (2).

Immunohistochemistry. Slices were stained with a rabbit polyclonal antibody against β -gal (1:500, Cappel) followed by Alexa 488 conjugated goat anti-rabbit immunoglobulin (1:100, Molecular Probes). NMJs were identified by labeling acetylcholine receptor (AChR) with tetramethylrhodamine-labeled α -bungarotoxin (BTX, 2 μ g/ml, Calbiochem) at 37°C for 30 min. Confocal laser scanning immunofluorescence analysis was performed with a TCS4D confocal microscope (Zeiss) using a Laser Technic argon-krypton laser (Leica, Deerfield, IL) in multiline operating mode. Fluorescence acquisition was performed with the 488- and 568-nm lasers lines.

Gastrocnemius Denervation Experiments. In four mice, sciatic nerve transection was performed under deep anesthesia. Approximately 5 mm of nerve were removed. Mice were checked for hind limb paralysis after surgery. Eighteen hours after nerve transection, mice were inoculated in the denervated gastrocnemius as described above. For controls, mice were inoculated contralaterally into the innervated gastrocnemius. Sciatic nerves were examined at necropsy, and transections were confirmed in all cases.

***In Vivo* Tetrodotoxin (TTX) and BTX Administrations.** For TTX (Sigma) administration, four mice were anesthetized, and the left

Abbreviations: TTC, C-terminal fragment of tetanus toxin; NMJ, neuromuscular junction; β -gal, β -galactosidase; X-Gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactoside; AChR, acetylcholine receptor; BTX, tetramethylrhodamine-labeled α -bungarotoxin; TTX, tetrodotoxin.

[†]F.J.M.-M. and S.R. contributed equally to this work.

[§]To whom reprint requests should be addressed. E-mail: pbrulet@pasteur.fr.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. §1734 solely to indicate this fact.

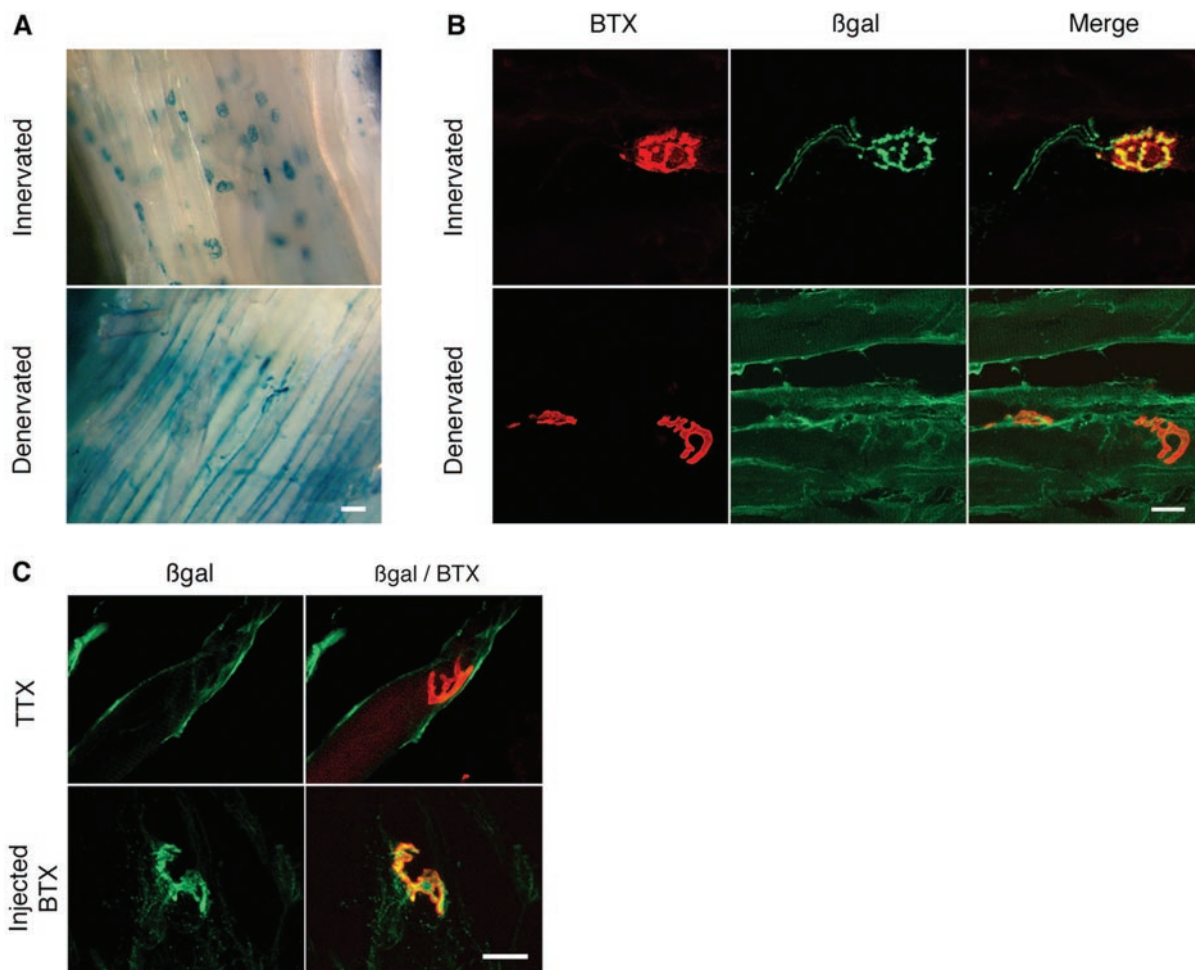


Fig. 1. Activity-dependent β -gal-TTC localization at the NMJ. (A) The fusion protein was injected intramuscularly in innervated gastrocnemius or 18 h after sciatic nerve transection. Protein localization was investigated 6 h later *in toto* by X-Gal coloration. β -Gal-TTC protein was localized mainly at the NMJ in innervated gastrocnemius, whereas the denervated muscle showed a diffuse distribution of the fusion protein along the surface structures, with no labeling in the motoneuron being detected. (B) Coimmunocytolocalization of β -gal-TTC by an anti- β -gal antibody and of the NMJ by BTX. In innervated muscle (Upper), a strong β -gal-TTC concentration was detected at the NMJ and into axons. By contrast, in denervated gastrocnemius (Lower), the fusion protein was not concentrated specifically in inactive NMJ. A weak colabeling observed in some cases was not significant as determined by using the Student's *t* test with a standard statistical threshold of a 5% significance ($P < 0.001$). (C) Confocal colocalization analysis after TTX blockage of nerve conduction (Upper) or after postsynaptic transmission blockage by BTX (Lower). After TTX administration, the same β -gal-TTC distribution was observed as that in denervated muscle. Injection of a saturating dose of fluorescently labeled BTX, which stops muscle stimulation without affecting nerve functionality, had no effect on β -gal-TTC distribution. (Scale bars: A, 40 μ m; B–C, 20 μ m.)

sciatic nerve was exposed in the upper thigh. An osmotic minipump (Alzer 1007D) containing TTX (500 μ g/ml) was s.c.-implanted as described (3). Nerve-conduction blockage was maintained for 4 days. The absence of toe extension and flexion reflexes, indicators of a complete and continuous nerve-conduction blockage, were tested daily. As control, an osmotic minipump was filled with a sterile saline solution and implanted in the same way as in others animals. No muscle blockade was detected. β -Gal-TTC hybrid protein was injected bilaterally in the gastrocnemius 4 days after the minipump implantation. BTX (6 μ g in 30 μ l of sterile saline, Calbiochem) was injected under anesthesia in the left gastrocnemius of four mice 30 min before β -gal-TTC hybrid protein injection. Alternatively, BTX was injected 12 h before protein injection. Paralysis of the left hind limb was obvious after recovery from anesthesia and for the following hours.

Results

β -Gal-TTC Endocytosis Depends on Neuronal Activity. After β -gal-TTC injection into hind limb or tongue muscles, the hybrid

protein binds rapidly to the NMJ (Figs. 1A and 4, respectively). Its transport along the motoneuronal axon leaving the NMJ also is rapidly detectable (Fig. 1B). To assess the influence of motor nerve activity the sciatic-gastrocnemius system was chosen, because it is easier to reach and manipulate than the hypoglossal nerve. Injection of β -gal-TTC fusion protein was performed 18 h after axotomy into innervated and denervated gastrocnemius, with visualization of protein localization performed 6 h later. A spectacular effect was observed after nerve sectioning *in vivo*; the hybrid protein distribution was strongly affected (Fig. 1A and B). β -Gal-TTC no longer stained the NMJ, and no axonal labeling of the motoneuron synapse ending was detectable. This effect was observed in less than 1 day after denervation and thus more rapidly than the AChR redistribution or the reorganization of the Golgi apparatus (4). Neuronal integrity therefore is necessary for TTC internalization into the motoneuron and also for its concentration at the NMJ. To locate the origin of the activity necessary for TTC endocytic transport precisely, two specific neurotoxins, TTX and BTX, were used *in vivo*. Mice were checked for NMJ physiological inactivation by paralysis of

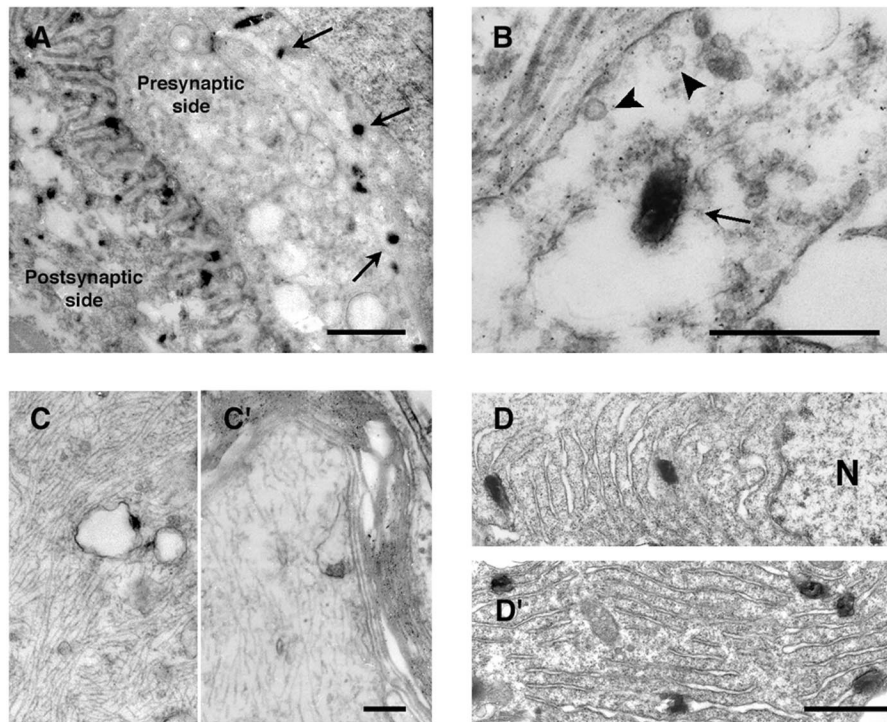


Fig. 2. β -Gal-TTC neuronal localization by electron microscopy. Electron microscopic analysis was performed by using X-Gal reaction with the electron-dense 5-bromo-4-chloro-3-indol precipitate. (A) On the NMJ motoneuronal side, X-Gal signals (arrows) were detected away from the active zone into large uncoated vesicles (B, arrow); no labeling was detected in small coated synaptic vesicles (B, arrowhead). (C and C') Staining along the axon was associated with the membranes of large vesicles. (D) In motoneuronal soma, precipitate was found in the perinuclear endoplasmic reticulum. N; nuclei. (Scale bars: A, 1 μ m; B, 0.4 μ m; C and C', 0.2 μ m; D and D', 0.5 μ m.)

the hind limb. Presynaptic neuromuscular activity was blocked by TTX, a specific sodium channel-inhibitory agent. TTX is less traumatic than axotomy, because only synaptic transmission is blocked without affecting nerve integrity. Four days after chronic perfusion of the sciatic nerve with TTX (3), β -gal-TTC was injected, and the protein distribution was analyzed (Fig. 1C). By *in toto* analysis, β -gal-TTC appeared, as by axotomy, to be distributed along the entire muscle length rather than concentrated at the NMJ. No labeling was detected along the axon and synaptic ending nor significantly in the NMJ. Postsynaptic transmission was subsequently stopped by BTX, which specifically binds and blocks the AChR without affecting nerve functionality. The spatial and temporal characteristics of the fusion protein endocytic traffic appeared normal in both muscle and motoneuron, although the hind limb was paralyzed (Fig. 1C). AChR stimulation in the postsynaptic membrane therefore is not involved in the detected endocytic transport.

β -Gal-TTC Is Always Associated with Membranous Compartments. To study the cellular compartments involved more precisely, electron microscopy analysis was performed. In the presynaptic side, staining was observed in large uncoated vesicles (200–300 nm; Fig. 2A and B) and all along the axon (150–200 nm) (Fig. 2C and C'). In the motoneuron soma, which contains most of the staining, the hybrid protein was linked to the endoplasmic reticulum membrane around the nucleus (Fig. 2D and D'). Labeling was always associated to membranes; it was never found free in the vesicles lumen, cytoplasm, or other structures. We noticed that Schwann cells were also labeled weakly (data not shown). At the postsynaptic side of the NMJ, a strong staining was always associated to membranes: linked to the junctional folds membranes (Fig. 3A), associated with vesicular body membranes of the under end-plate region (Fig. 3A) and the

plasma membrane (Fig. 3D), among the myofibrils associated with the sarcoplasmic reticulum membranes (Fig. 3B and D), linked to the perinuclear endoplasmic reticulum membrane of the subjunctional nuclei (Fig. 3C and C'), around or into the mitochondria (Fig. 3D), and linked to membranes associated with transverse tubules (data not shown). A weak staining in the extrajunctional areas of muscle cells also could be detected similarly localized at the plasma and sarcoplasmic reticulum membranes and at the perinuclear reticulum (data not shown). Finally, an intense vesicular staining also was observed in blood vessel endothelial cells (Fig. 3E). In denervated gastrocnemius, in agreement with fluorescent and X-Gal stainings (Fig. 1), all labeling was detected along the muscle cells associated with the plasma and sarcoplasmic reticulum membranes and to a lesser extent linked to the perinuclear endoplasmic reticulum membrane (data not shown). We conclude that the fusion protein is always transported associated with membranous compartments.

Kinetic Analysis of β -Gal-TTC Endocytic Pathways. To characterize *in vivo* the cellular mechanisms of those endocytic pathways further, kinetic analyses in neuron and muscle were performed. When the fusion protein was injected into the tongue, the hybrid protein was transported in less than 2 h to the motoneuron soma localized in the brainstem hypoglossal nuclei (Fig. 4D), and a more intense staining was obtained after 6 h (Fig. 4C and E). These data are consistent with the known intraaxonal retrograde transport (200 mm/day) of membranous organelles associated with microtubules (for review see ref. 5). In muscle, however, the hybrid protein was concentrated rapidly at the postsynaptic side of the NMJ (Fig. 4A and B) even with very low protein concentration (1 μ g) but was never observed in a significant amount in the deep muscle structures. Moreover, after 24–48 h, most of the NMJ staining had disappeared. Stability of the

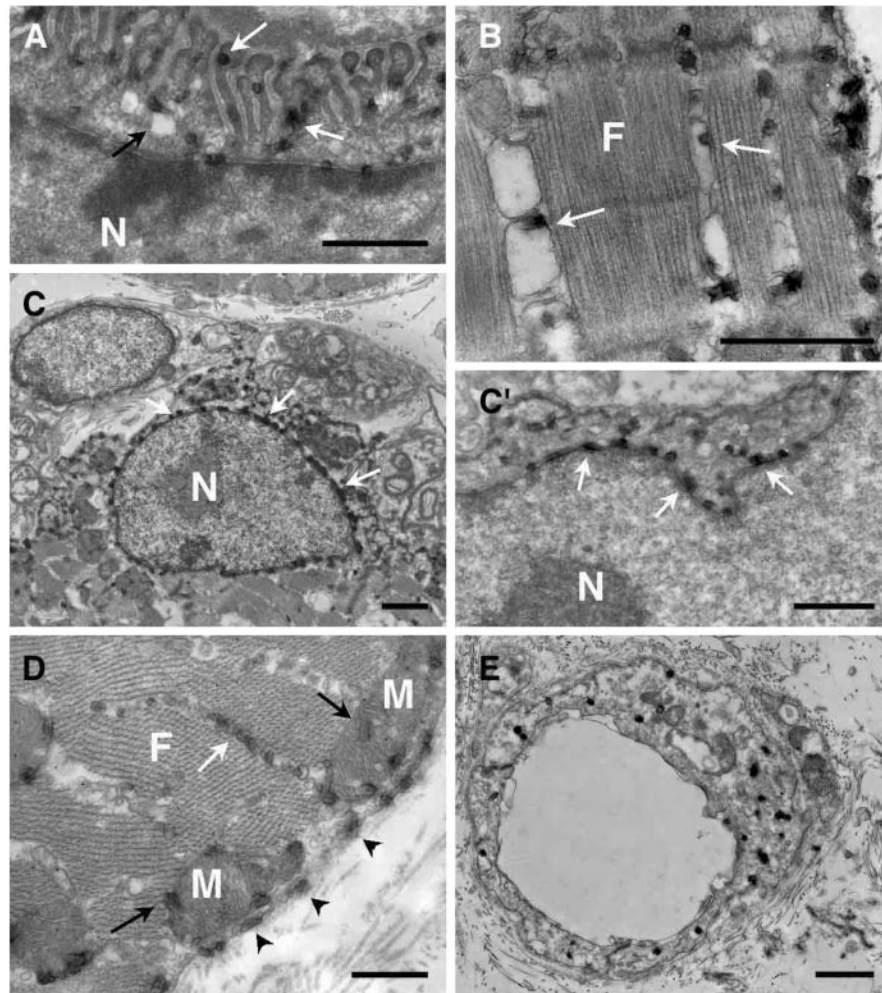


Fig. 3. β -Gal-TTC intramuscular localization by electron microscopy. (A) A strong fusion protein concentration was observed on the NMJ postsynaptic side. Staining was detected associated with the junctional folds membranes (white arrows) and vesicular membranes (black arrows). Labeling also was observed in the sarcoplasmic reticulum (white arrows, B and D). Around the subjunctional nuclei, staining was associated with the endoplasmic reticulum (C and C', white arrows). (D) Precipitate also was observed in mitochondria (black arrows) and associated with the muscle plasma membrane (arrowheads). (E) In blood vessel endothelial cells, an intense staining also was detected, linked to smaller vesicle membranes. F, myofibrils; N, nuclei; M, mitochondria. (Scale bars, 1 μ m.)

protein is not involved, because it could be detected after several days in neuronal (1) and endothelial cells (data not shown). An exocytosis process at the NMJ could explain these data. Indeed, after DNA intramuscular injection, the hybrid protein was secreted by a muscle fiber at the NMJ. In this case, expression of β -gal-TTC has been observed in a single fiber, followed by hypoglossal nerve and nuclei labeling (data not shown and ref. 6).

Discussion

Retrograde transcellular signaling through the synaptic cleft is known to play crucial roles in the formation, maturation, and plasticity of synaptic connections (7, 8). However, the molecular mechanisms involved in a protein transneuronal transport between two synaptically interconnected cells are not identified yet. In previous work, we have shown that the TTC, fused to a reporter gene, could be used to analyze simple neuronal networks (1). In this *in vivo* study at an NMJ, endocytic pathways have been investigated and visualized by intramuscular injection of the purified hybrid protein. Endogenous motoneuronal activity strongly affects β -gal-TTC endocytic pathways. Axotomy and TTX *in vivo* delivery away from the target muscle prohibit β -gal-TTC neuronal internalization but also β -gal-TTC traffic

and concentration at the NMJ. However, blocking muscular AChR activity by BTX administration yields no effect, establishing the role of presynaptic activity on internalization and concentration of the fusion protein. Neural activity-induced changes in the organization of the muscle Golgi complex and microtubules have been reported already, although they occur on a much longer time scale (4, 9). Regulation of gene expression by specific patterns of impulse activity is essential for skeletal muscle functions (ref. 10 and references therein). However, in our studies β -gal-TTC traffic in muscle to the NMJ is completed in less than 2 h, and in motoneuron by that time, the soma starts to be labeled. Fast endocytic pathways therefore are involved.

Endocytosis of the fusion protein requires that TTC first binds to its specific receptors present on the cell plasma membranes. Two different receptors for tetanus neurotoxin have been identified, polysialogangliosides GD1b and GT1b and an *N*-glycosylated 15-kDa receptor protein, p15, with a reported expression on neural cells. The TTC fragment also displays gangliosides and p15-binding properties (11–15). Compared with neuronal tissues, b-type gangliosides are expressed less abundantly in skeletal muscle or endothelial cells (16, 17), but that could explain binding and endocytosis into these cells. Gangliosides are known to segregate into membrane lipid microdomains

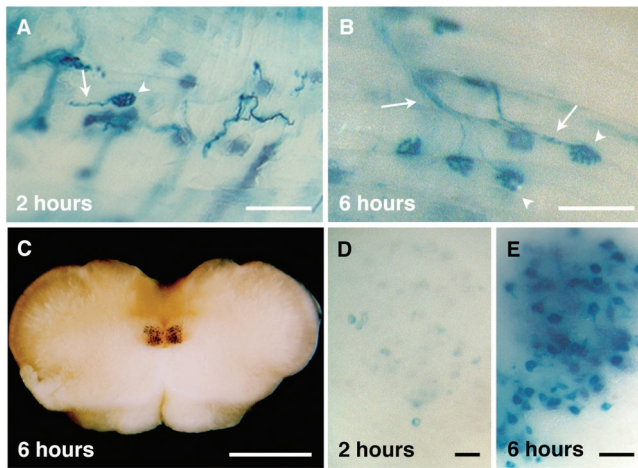


Fig. 4. β -Gal-TTC transport kinetics into the hypoglossal nuclei. The hybrid protein was injected intramuscularly into the tongue, and an *in toto* X-Gal staining was performed 2 (A and D) or 6 (B, C, and E) h later. β -Gal-TTC was concentrated rapidly at the NMJ and taken up by the connected axons (A and B, arrowheads and arrows, respectively). Motoneuronal soma in the hypoglossal nuclei displayed a weaker intensity 2 h (D) than 6 h after injection (E). (C) Brainstem section showing the hypoglossal nuclei stained 6 h postinjection. (Scale bars: A–B, 100 μ m; C, 1 mm; D–E, 20 μ m.)

called rafts and/or caveolae, which contain high amounts of glycosphingolipids and cholesterol but also are enriched in a specific signaling molecule(s) (for reviews see refs. 18–20). The aggregation of surface molecules is a fundamental mechanism for a cell to regulate transmembrane signaling as well as the first step in endocytosis. Recently it was reported that agrin, an aggregating protein crucial for the formation of the NMJ, is important in the reorganization of membrane lipid microdomains and mediates their active directional transport to the area of cell–cell contact in neural and immune cells (21). Agrin, secreted from motoneuron and muscle cells, acts extracellularly to trigger the local aggregation of molecules. Alternative splicing is known, resulting in several agrin isoforms with varying aggregating activity (22). Neuronal activity via secreted molecules such as agrin could induce a clustering of disperse and specific rafts at the NMJ, perhaps for signal transduction such as Ras signaling recently reported to be involved in nerve activity-dependent regulation of muscle genes (19, 23). By this way, β -gal-TTC bound to its membrane receptors could be concentrated at the NMJ directly or after an internalization step when rafts reach a critical size. Without neural activity, internalization could occur all along the muscle surface into the sarcoplasmic reticulum, but the dynamics of concentration or clustering would be impaired.

In nerve terminals, intense clathrin-mediated and clathrin-independent synaptic vesicle traffic has been described extensively and is crucial for synaptic transmission (24–27). The recycling traffic of small synaptic vesicles has been postulated to be essential to the neurotoxin internalization (28). However, on cultured spinal cord neurons or liver cells, noncoated invaginations and vesicles are involved (29, 30). In our experiments, the hybrid protein was found away from the active zones in large uncoated vesicles. Our experimental approach does not allow the detection of the dynamics of the first initial endocytic steps, and we could not eliminate the possibility that the fusion protein was first taken up at the NMJ into small synaptic vesicles before being delivered into larger vesicles. These latter vesicles likely are intermediary compartments such as endosome-like vacuoles (31) or caveosome-like compartment as described recently in simian virus 40-infected epithelial cells (32). They can undergo

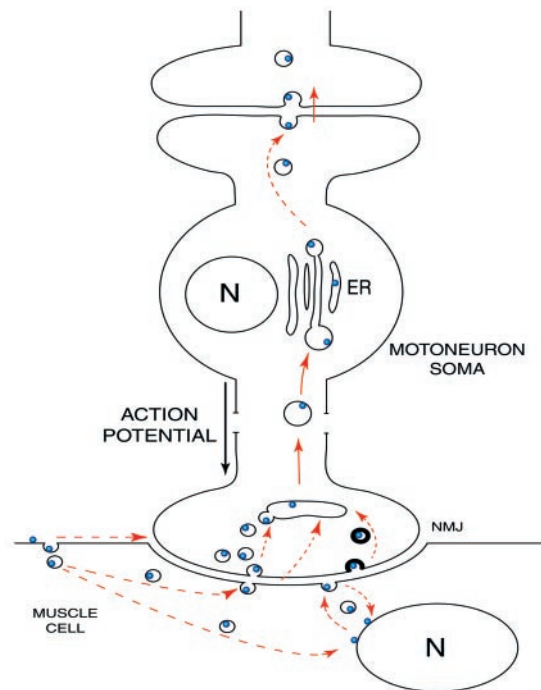


Fig. 5. β -Gal-TTC presumed pathways. After intramuscular injection, β -gal-TTC is concentrated rapidly at the NMJ. The dashed arrows represent various hypothetical pathways. In motoneurons, the hybrid protein is found in large uncoated vesicles and then transported retrogradely to the endoplasmic reticulum (ER). Internalization by an interconnected neuron will then occur. N, nuclei.

fusion and fission reactions that could explain the smaller size of axonic vesicles detected in our experiments.

During host cell invasion, a broad range of microorganisms are known to co-opt lipid rafts trafficking. Pathogens and their products such as *Escherichia coli* heat-labile toxin type I and cholera toxin, which binds GM1 gangliosides at the cell surface (33, 34), or viruses such as simian virus 40 (35) are transported via caveolae to specific compartments inside the cell. By this means, they avoid lysosomal degradation and are targeted to particular subcellular sites. The tetanus toxin TTC fragment, which binds to its membranous receptors gangliosides GT1b, GD1b, and/or p15 protein, allows us to visualize such an endocytic constitutive pathway inside the central nervous system. In muscle and neural cells, the hybrid protein thus is sorted to different fates and subcellular localizations (Fig. 5). In motoneurons, the hybrid protein is taken up rapidly in nerve endings and transported across the cell to dendrites avoiding degradation. Transsynaptic transfer to interconnected neurons then will occur (1), presumably by a similar activity-dependent exocytic-endocytic pathway. By contrast, in muscle cells the reaction is transitory and localized to the muscle surface structures, a directional transport concentrating the hybrid protein rapidly to the NMJ. Whatever the details of the traffic mechanisms, the net overall effect is β -gal-TTC transport from an active motoneuronal junction to an active dendritic synapse. Further studies are needed to analyze this membrane traffic molecularly and to know if such feedback that sense neuronal activity could be an integrative mechanism at the neural network level.

Such a retrograde transsynaptic reporter protein would be extremely useful to analyze morphological and structural

changes associated with activity during the formation, maturation, and plasticity of synaptic connections. Its application in transgenic animals, however, will require engineering to target the transgene to the appropriate vesicular subpopulation.

We thank Drs. M. Lemonnier and J. Cartaud for their helpful comments and P. Roux for expert assistance in confocal analysis. This

work was supported by European Commission Grant QL3 CT2000 01625, a grant from the Association Française contre les Myopathies, a grant from the Centre National de la Recherche Scientifique, and Fondo de Investigacion Sanitaria Grant FIS97/0607. F.J.M.-M. was supported by a fellowship from the Ministerio de Educacion, Cultura y Deporte, and S.R. was supported by a fellowship from the Association Française Contre les Myopathies.

1. Coen, L., Osta, R., Maury, M. & Brûlet, P. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 9400–9405.
2. Bonnerot, C., Rocancourt, D., Briand, P., Grimber, G. & Nicolas, J. F. (1987) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**, 6795–6799.
3. Costanzo, E. M., Barry, J. A. & Ribchester, R. R. (2000) *Nat. Neurosci.* **3**, 694–700.
4. Jasmin, B. J., Antony, C., Changeux, J. P. & Cartaud, J. (1995) *Eur. J. Neurosci.* **7**, 470–479.
5. Goldstein, L. S. B. & Yang, Z. (2000) *Annu. Rev. Neurosci.* **23**, 39–71.
6. Coen, L., Kissa, K., Le Mevel, S., Brûlet, P. & Demeneix, B. A. (1999) *Int. J. Dev. Biol.* **43**, 823–830.
7. Fitzsimonds, R. M. & Poo, M. M. (1998) *Physiol. Rev.* **78**, 143–170.
8. Tao, H. W. & Poo, M. M. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**, 11009–11015.
9. Ralston, E., Ploug, T., Kalhovde, J. & Lomo, T. (2001) *J. Neurosci.* **21**, 875–883.
10. Buonanno, A. & Fields, R. D. (1999) *Curr. Opin. Neurobiol.* **9**, 110–120.
11. Emsley, P., Fotinou, C., Black, I., Fairweather, N. F., Charles, I. G., Watts, C., Hewitt, E. & Isaacs, N. W. (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 8889–8894.
12. Halpern, J. L. & Neale, E. A. (1995) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **195**, 221–241.
13. Herreros, J., Lalli, G., Montecucco, C. & Schiavo, G. (2000) *J. Neurochem.* **74**, 1941–1950.
14. Herreros, J., Lalli, G. & Schiavo, G. (2000) *Biochem. J.* **347**, 199–204.
15. Sinha, K., Box, M., Lalli, G., Schiavo, G., Schneider, H., Groves, M., Siligardi, G. & Fairweather, N. (2000) *Mol. Microbiol.* **37**, 1041–1051.
16. Duvar, S., Peter-Katalinic, J., Hanisch, F. G. & Müthing, J. (1997) *Glycobiology* **7**, 1099–1109.
17. Müthing, J., Maurer, U., Sostaric, K., Neumann, U., Brandt, H., Duvar, S., Peter-Katalinic, J. & Weber-Schürholz, S. (1994) *J. Biochem.* **115**, 248–256.
18. Anderson, R. G. W. (1998) *Annu. Rev. Biochem.* **67**, 199–225.
19. Simons, K. & Toomre, D. (2000) *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **1**, 31–40.
20. Smart, E. J., Graf, G. A., McNiven, M. A., Sessa, W. C., Engelman, J. A., Scherer, P. E., Okamoto, T. & Lisanti, M. P. (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 7289–7304.
21. Khan, A. A., Bose, C., Yam, L. S., Soloski, M. J. & Rupp, F. (2001) *Science* **292**, 1681–1686.
22. Ferns, M., Hoch, W., Campanelli, J. T., Rupp, F., Hall, Z. W. & Scheller, R. H. (1993) *Neuron* **8**, 1079–1086.
23. Murgia, M., Serrano, A. L., Calabria, E., Pallafacchina, G., Lomo, T. & Schiaffino, S. (2000) *Nat. Cell Biol.* **2**, 142–147.
24. Daly, C., Sugimori, M., Moreira, J. E., Ziff, E. B. & Llinas, R. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**, 6120–6125.
25. De Camilli, P. & Takei, K. (1996) *Neuron* **16**, 481–486.
26. Palfrey, H. C. & Artalejo, C. R. (1998) *Neuroscience* **83**, 969–989.
27. Schweizer, F. E., Betz, H. & Augustine, G. J. (1995) *Neuron* **14**, 689–696.
28. Matteoli, M., Verderio, C., Rossetto, O., Iezzi, N., Coco, S., Schiavo, G. & Montecucco, C. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**, 13310–13315.
29. Montesano, R., Roth, J., Robert, A. & Orci, L. (1982) *Nature (London)* **296**, 651–653.
30. Parton, R. G., Ockleford, C. D. & Critchley, D. R. (1987) *J. Neurochem.* **49**, 1057–1068.
31. Takei, K., Mundigl, O., Daniell, L. & De Camilli, P. (1996) *J. Cell Biol.* **133**, 1237–1250.
32. Pelkmans, L., Kartenbeck, J. & Helenius, A. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 473–483.
33. Lencer, W. I., Hirst, T. R. & Holmes, R. K. (1999) *Biochem. Biophys. Acta* **1450**, 177–190.
34. Wolf, A. A., Jobling, M. G., Wimer-Mackin, S., Ferguson-Maltzman, M., Madara, J. L., Holmes, R. K. & Lencer, W. I. (1998) *J. Cell Biol.* **141**, 917–927.
35. Anderson, H. A., Chen, Y. & Norkin, L. C. (1996) *Mol. Biol. Cell* **7**, 1825–1834.

CONCLUSIONES

5. CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de las experiencias realizadas se han obtenido siguientes conclusiones:

A) SOBRE LA INOCUIDAD DEL VEHÍCULO

1ª.- El fragmento C de la toxina tetánica tras inyección intramuscular de DNA plasmídico o como proteína no ocasiona lesiones en el tejido donde es aplicado.

2ª.- La inyección intramuscular en forma de proteína (gran cantidad) o de DNA desnudo (gran tiempo de expresión) del fragmento C no produce sintomatología nerviosa o de cualquier otro tipo en los animales.

B) SOBRE LA EXPRESIÓN DEL VEHÍCULO EN CÉLULAS EUCARIOTAS

3ª.- Tras la inyección intramuscular en lengua de rata los plásmidos pCMV-NLS-LacZ, pCMV-LacZ y CMV-LacZ-TTC comienzan su expresión antes de las 24 horas post-inyección para mantenerse como mínimo hasta los dos meses de la inoculación.

4ª.- La presencia del fragmento C fusionado a la β -galactosidasa en el plásmido inyectado no modifica significativamente la expresión si se compara con la mostrada por la β -galactosidasa en solitario, ya sea de localización nuclear o citoplásmica. Este hecho es independiente de la dosis administrada y el tiempo transcurrido desde la inyección,

5ª.- Tras la inyección intramuscular de DNA desnudo en la lengua de rata la máxima expresión tiene lugar a corto plazo y cuando se administran dosis altas. El pico de expresión se produce durante los cuatro primeros días post-inyección independientemente de la dosis y el plásmido administrados.

6ª.- La dosis administrada influye proporcionalmente en la expresión según el tiempo transcurrido desde la inyección. A corto plazo es dos veces superior en dosis altas que bajas. A medio plazo la diferencia disminuye, y no se observa ninguna diferencia a largo plazo.

7ª.- Se ha observado una falta de respuesta humoral ante la inyección intramuscular de DNA desnudo incluso en presencia del fragmento C de la toxina tetánica, no observándose diferencias

significativas en el nivel de γ -globulinas en el suero de los animales, independientemente del plásmido administrado o del nivel de expresión.

C) SOBRE EL TRANSPORTE DEL VEHÍCULO

8^a.- A las 24 horas postinyección del ADN desnudo, se produce la salida de la molécula de fusión β -galactosidasa-TTC de las células musculares se detecta a las 24 horas post-inyección, así como su entrada en las células musculares vecinas.

9^a.- A los 4 días postinyección del plásmido pCMV-LacZ-TTC, se visualiza la actividad β -galactosidasa en los cuerpos de las neuronas conectadas al músculo a partir de los cuatro días post-inyección.

10^a.- El transporte de la proteína híbrida se debe al fragmento C de la toxina tetánica.

11^a.- El fragmento C de la toxina tetánica, tras su administración en forma de inyección proteica o mediante su producción por las células musculares tras la inyección de DNA desnudo, es capaz de alcanzar el córtex motor manteniendo la actividad enzimática que le acompaña. Tras la inyección proteica las neuronas corticales aparecen marcadas a las 6 horas post-inyección, así como alguno de los núcleos que proyectan sobre el hipogloso en el bulbo raquídeo. Este mismo marcaje es observado a los cuatro días tras la inyección de ADN desnudo.

12^a.- El TTC presenta un alto tropismo por la placa motora y la red de motoneuronas que inervan al músculo, aunque también se localiza en menor medida en otros tipos celulares: endotelios, células musculares y de modo anecdótico en células de Schwann.

13^a.- *In vivo*, el fragmento C de la toxina tetánica se encuentra siempre asociado a membranas, ya sea en orgánulos, vesículas, membrana nuclear o membrana plasmática. A nivel de la placa motora se encuentra en vesículas "no recubiertas", entre las que se encuentran las caveolas.

14^a.- La molécula, durante su transporte axonal, se localiza en la luz de vesículas membranosas asociadas a microtúbulos, mostrando además una alta velocidad de migración. Ambas características reafirman su transporte retrógrado intraxonal rápido (200mm/día).

15^a.- El tropismo del fragmento C de la toxina tetánica y su entrada en la placa motora depende de la actividad neuronal, perdiéndose cuando desaparece la misma, al igual que su transporte retroaxonal. Este hecho es de vital importancia para su utilización como vector de terapia génica en enfermedades neurodegenerativas de la motoneura.

D) SOBRE LA UTILIZACIÓN DEL VEHÍCULO PARA EL ESTUDIO DE LAS CONEXIONES NEURONALES

16^a.- El fragmento C de la toxina tetánica puede ser utilizado como trazador neuronal probablemente específico de circuitos neuronales activos.

17^a.- Debido a sus características la proteína de fusión β -gal-TTC se presenta como una buena herramienta para el estudio en profundidad del funcionamiento de la placa motora, utilizada como modelo de sinapsis del SNC.

BIBLIOGRAFIA

6. Bibliografía

- Abdallah B, Sachs L, Demeneix BA.** (1995). *Non-viral gene transfer: applications in developmental biology and gene therapy.* Biol Cell. 85, 1-7
- Ackerman SJ, Sullivan EM, Beusterien KM, Natter HM, Gelinás DF, Patrick DL.** (1999). *Cost effectiveness of recombinant human insulin-like growth factor I therapy in patients with ALS.* Pharmacoeconomics. 15, 179-195.
- Adler M, Deshpande SS, Sheridan RE, Lebeda FJ.** (1994). *Evaluation of captopril and other potential therapeutic compounds in antagonizing botulinum toxin-induced muscle paralysis. In: Therapy with Botulinum toxin.* New York: Dekker
- Ahnert-Hilger G, Weller U, Dauzenroth ME, Habermann E, Gratzl M.** (1989). *The tetanus toxin light chain inhibits exocytosis.* FEBS Lett. 242, 245-248.
- Alder GM, Bashford CL, Pasternak CA.** (1990). *Action of diphtheria toxin does not depend on the induction of large, stable pores across biological membranes.* J Membr Biol. 67-74
- Alexander GM, Deitch JS, Seeburger JL, Del Valle L, Heiman-Patterson TD.** (2000). *Elevated cortical extracellular fluid glutamate in transgenic mice expressing human mutant (G93A) Cu/Zn superoxide dismutase.* J Neurochem. 74, 1666-1673.
- Alexianu ME, Ho BK, Mohamed AH, La Bella V, Smith RG, Appel SH.** (1994). *The role of calcium-binding proteins in selective motoneuron vulnerability in amyotrophic lateral sclerosis.* Ann Neurol. 36, 846-858.
- Alisky JM, Davidson BL.** (2000). *Gene therapy for amyotrophic lateral sclerosis and other motor neuron diseases.* Hum Gene Ther. 11, 2315-2329.
- Anand P, Parrett A, Martin J, Zeman S, Foley P, Swash M, Leigh PN, Cedarbaum JM, Lindsay RM, Williams-Chestnut RE, et al.** (1995). *Regional changes of ciliary neurotrophic factor and nerve growth factor levels in post mortem spinal cord and cerebral cortex from patients with motor disease.* Nat Med. 1, 168-172.
- Anderson RD, Haskell RE, Xia H, Roessler BJ, Davidson BL.** (2000). *A simple method for the rapid generation of recombinant adenovirus vectors.* Gene Ther. 7, 1034-1038.
- Anderson WF.** (1992). *Human gene therapy.* Science. 256, 808-813.

- Askmark H, Aquilonius SM, Gillberg PG, Liedholm LJ, Stalberg E, Wuopio R.** (1993). *A pilot trial of dextromethorphan in amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurol Neurosurg Psychiatry. 56, 197-200.
- Azzouz M, Hottinger A, Paterna JC, Zurn AD, Aebischer P, Bueler H.** (2000). *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. 9, 803-811.
- Bambrick L, Gordon T.** (1994). *Neurotoxins in the study of neural regulation of membrane proteins in skeletal muscle.* J Pharmacol Toxicol Methods. 32, 129-138.
- Bantel-Schaal U, Delius H, Schmidt R, zur Hausen H.** (1999). *Human adeno-associated virus type 5 is only distantly related to other known primate helper-dependent parvoviruses.* J Virol. 73, 939-947.
- Barry JA, Ribchester RR.** (1995). *Persistent polyneuronal innervation in partially denervated rat muscle after reinnervation and recovery from prolonged nerve conduction block.* J Neurosci. 15, 6327-6339.
- Beaude P, Delacour A, Bizzini B, Domuado D, Remy MH.** (1990). *Retrograde axonal transport of an exogenous enzyme covalently linked to B-IIb fragment of tetanus toxin.* Biochem J. 271, 87-91.
- Beaumelle B, Bensammar L, Bienvenue A.** (1992). *Selective translocation of the A chain of diphtheria toxin across the membrane of purified endosomes.* J Biol Chem. 267, 11525-11531.
- Beise J, Hahnen J, Andersen-Beckh B, Dreyer F.** (1994). *Pore formation by tetanus toxin, its chain and fragments in neuronal membranes and evaluation of the underlying motifs in the structure of the toxin molecule.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 349, 66-73.
- Benecke R, Takano K, Schmidt J, Henatsch HD.** (1977). *Tetanus toxin induced actions on spinal Renshaw cells and Ia-inhibitory interneurons during development of local tetanus in the cat.* Exp Brain Res. 27, 271-286.
- Bergey GK, MacDonald RL, Habig WH, Hardegree MC, Nelson PG.** (1983). *Tetanus toxin: convulsant action on mouse spinal cord neurons in culture.* J Neurosci. 3, 2310-2323.
- Betz WJ, Angleson JK.** (1998). *The synaptic vesicle cycle.* Annu Rev Physiol. 60, 347-363

- Bilak MM, Shifrin DA, Corse AM, Bilak SR, Kuncel RW.** (1999). *Neuroprotective utility and neurotrophic action of neurturin in postnatal motor neurons: comparison with GDNF and persephin.* Mol Cell Neurosci. 13, 326-336.
- Bittner MA, DasGupta BR, Holz RW.** (1989a). *Isolated light chains of botulinum neurotoxins inhibit exocytosis. Studies in digitonin-permeabilized chromaffin cells.* J Biol Chem. 264, 10354-10360.
- Bittner MA, Habig WH, Holz RW.** (1989b). *Isolated light chain of tetanus toxin inhibits exocytosis: studies in digitonin-permeabilized cells.* J Neurochem. 53, 966-968.
- Bizzini B, Stoeckel K, Schwab M.** (1977). *An antigenic polypeptide fragment isolated from tetanus toxin: chemical characterization, binding to gangliosides and retrograde axonal transport in various neuron systems.* J Neurochem. 28, 529-542.
- Bizzini B, Grob P, Glicksman MA, Akert K.** (1980). *Use of the B-IIb tetanus toxin derived fragment as a specific neuropharmacological transport agent.* Brain Res. 193, 221-227.
- Bizzini B, Grob P, Akert K.** (1981). *Papain-derived fragment IIc of tetanus toxin: its binding to isolated synaptic membranes and retrograde axonal transport.* Brain Res. 210, 291-299.
- Black JD, Dolly JO.** (1986a). *Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. II. Autoradiographic evidence for its uptake into motor nerves by acceptor-mediated endocytosis.* J Cell Biol. 103, 535-544.
- Black JD, Dolly JO.** (1986b). *Interaction of 125I-labeled botulinum neurotoxins with nerve terminals. I. Ultrastructural autoradiographic localization and quantitation of distinct membrane acceptors for types A and B on motor nerves.* J Cell Biol. 535-544
- Blaese RM, Culver KW, Miller AD, Carter CS, Fleisher T, Clerici M, Shearer G, Chang L, Chiang Y, Tolstoshev P, et al.** (1995). *T lymphocyte-directed gene therapy for ADA- SCID: initial trial results after 4 years.* Science. 270, 475-480.
- Blaustein RO, Germann WJ, Finkelstein A, DasGupta BR.** (1987). *The N-terminal half of the heavy chain of botulinum type A neurotoxin forms channels in planar phospholipid bilayers.* FEBS Lett. 226, 115-120.
- Boquet P, Dufloot E.** (1982). *Tetanus toxin fragment forms channels in lipid vesicles at low pH.* Proc Natl Acad Sci U S A. 79, 7614-7618.

- Boquet P, Duflot E, Hauttecoeur B.** (1984). *Low pH induces a hydrophobic domain in the tetanus toxin molecule.* Eur J Biochem. 144, 339-344.
- Borasio GD, Robberecht W, Leigh PN, Emile J, Guilloff RJ, Jerusalem F, Silani V, Vos PE, Wokke JH, Dobbins T.** (1998). *A placebo-controlled trial of insulin-like growth factor-I in amyotrophic lateral sclerosis.* European ALS/IGF-I Study Group. Neurology. 51, 583-586.
- Bordignon C, Notarangelo LD, Nobili N, Ferrari G, Casorati G, Panina P, Mazzolari E, Maggioni D, Rossi C, Servida P, et al.** (1995). *Gene therapy in peripheral blood lymphocytes and bone marrow for ADA- immunodeficient patients.* Science. 270, 470-475.
- Boris-Lawrie KA, Temin HM.** (1993). *Recent advances in retrovirus vector technology.* Curr Opin Genet Dev. 3, 102-109.
- Borthwick GM, Johnson MA, Ince PG, Shaw PJ, Turnbull DM.** (1999). *Mitochondrial enzyme activity in amyotrophic lateral sclerosis: implications for the role of mitochondria in neuronal cell death.* Ann Neurol. 46, 787-790.
- Bregman BS, Broude E, McAtee M, Kelley MS.** (1998). *Transplants and neurotrophic factors prevent atrophy of mature CNS neurons after spinal cord injury.* Exp Neurol. 149, 13-27.
- Bromberg MB.** (1999). *Pathogenesis of amyotrophic lateral sclerosis: a critical review.* Curr Opin Neurol. 12, 581-588.
- Brooks BR.** (1994). *El Escorial World Federation of Neurology criteria for the diagnosis of amyotrophic lateral sclerosis. Subcommittee on Motor Neuron Diseases/Amyotrophic Lateral Sclerosis of the World Federation of Neurology Research Group on Neuromuscular Diseases and the El Escorial "Clinical limits of amyotrophic lateral sclerosis" workshop contributors.* J Neurol Sci. 124 Suppl, 96-107.
- Brooks VB, Curtis DR, Eccles JC.** (1955). *Mode of action of tetanus toxin.* Nature. 120-121
- Brooks VB, Curtis DR, Eccles JC.** (1957). *The action of tetanus toxin on the inhibition of motoneurons.* J Physiol. 655-672
- Brown DA, London E.** (2000). *Structure, and function of sphingolipid-, and cholesterol-rich membrane rafts.* J Biol Chem. 17221-17224
- Brown RH.** (1994). *A transgenic-mouse model of amyotrophic lateral sclerosis.* N Engl J Med. 331, 1091-1092.

- Brown RH, Jr.** (1997). *Amyotrophic lateral sclerosis. Insights from genetics.* Arch Neurol. 54, 1246-1250.
- Brown WF, Doherty TJ, Chan M, Andres A, Provost SM.** (2000). *Human motor units in health and disease.* Muscle Nerve. Suppl 9:S7-18
- Bruschettini A.** (1892). *Sulla diffusione del veleno del tetano nell'organismo.* Rif. Med. 270-273
- Buchschacher GL, Jr., Wong-Staal F.** (2000). *Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases.* Blood. 95, 2499-2504.
- Budker V, Budker T, Zhang G, Subbotin V, Loomis A, Wolff JA.** (2000). *Hypothesis: naked plasmid DNA is taken up by cells in vivo by a receptor-mediated process.* J Gene Med. 2, 76-88.
- Bueler H.** (1999). *Adeno-associated viral vectors for gene transfer and gene therapy.* Biol Chem. 380, 613-622.
- Buffelli M, Pasino E, Cangiano A.** (1997). *Paralysis of rat skeletal muscle equally affects contractile properties as does permanent denervation.* J Muscle Res Cell Motil. 18, 683-695.
- Cabiaux V, Lorge P, Vandenbranden M, Falmagne P, Ruyschaert JM.** (1985). *Tetanus toxin induces fusion and aggregation of lipid vesicles containing phosphatidylinositol at low pH.* Biochem Biophys Res Commun. 128, 840-849.
- Cabot JB, Carroll J, Bogan N.** (1991). *Localization of cardiac parasympathetic preganglionic neurons in the medulla oblongata of pigeon, Columba livia: a study using fragment C of tetanus toxin.* Brain Res. 544, 162-168.
- Carter TA, Bonnemann CG, Wang CH, Obici S, Parano E, De Fatima Bonaldo M, Ross BM, Penchaszadeh GK, Mackenzie A, Soares MB, Kunkel LM, Gilliam TC.** (1997). *A multicopy transcription-repair gene, BTF2p44, maps to the SMA region and demonstrates SMA associated deletions.* Hum Mol Genet. 6, 229-236.
- Chang CC, Lee CY.** (1963). *Isolation of neurotoxins from the venom of Bungarus multicinctus and their modes of neuromuscular blocking action.* Arch Int Pharmacodyn Ther. 26, 241-257
- Coen L, Osta R, Maury M, Brulet P.** (1997). *Construction of hybrid proteins that migrate retrogradely and transynaptically into the central nervous system.* Proc Natl Acad Sci U S A. 94, 9400-9405.

- Coen L, Kissa K, le Mevel S, Brulet P, Demeneix BA.** (1999). *A somatic gene transfer approach using recombinant fusion proteins to map muscle-motoneuron projections in Xenopus spinal cord.* Int J Dev Biol. 43, 823-830.
- Colom LV, Alexianu ME, Mosier DR, Smith RG, Appel SH.** (1997). *Amyotrophic lateral sclerosis immunoglobulins increase intracellular calcium in a motoneuron cell line.* Exp Neurol. 146, 354-360.
- Cormery B, Francois Marini J, Gardiner PF.** (2000). *Changes in electrophysiological properties of tibial motoneurons in the rat following 4 weeks of tetrodotoxin-induced paralysis.* Neurosci Lett. 287, 21-24.
- Corse AM, Bilak MM, Bilak SR, Lehar M, Rothstein JD, Kuncel RW.** (1999). *Preclinical testing of neuroprotective neurotrophic factors in a model of chronic motor neuron degeneration.* Neurobiol Dis. 6, 335-346.
- Costanzo EM, Barry JA, Ribchester RR.** (2000). *Competition at silent synapses in reinnervated skeletal muscle.* Nat Neurosci. 3, 694-700.
- Cremona O, De Camilli P.** (1997). *Synaptic vesicle endocytosis.* Curr Opin Neurobiol. 7, 323-330.
- Critchley DR, Nelson PG, Habig WH, Fishman PH.** (1985). *Fate of tetanus toxin bound to the surface of primary neurons in culture: evidence for rapid internalization.* J Cell Biol. 100, 1499-1507.
- Curiel DT.** (1999). *Strategies to adapt adenoviral vectors for targeted delivery.* Ann N Y Acad Sci. 886, 158-171
- Curtis DR, Game CJ, Lodge D, McCulloch RM.** (1976). *A pharmacological study of Renshaw cell inhibition.* J Physiol. 258, 227-242.
- Dai C, Yang J, Liu Y.** (2002). *Single injection of naked plasmid encoding hepatocyte growth factor prevents cell death and ameliorates acute renal failure in mice.* J Am Soc Nephrol. 13, 411-422.
- Dani SU.** (1999). *The challenge of vector development in gene therapy.* Braz J Med Biol Res. 32, 133-145.
- Danko I, Fritz JD, Jiao S, Hogan K, Latendresse JS, Wolff JA.** (1994). *Pharmacological enhancement of in vivo foreign gene expression in muscle.* Gene Ther. 1, 114-121.

- Danko I, Williams P, Herweijer H, Zhang G, Latendresse JS, Bock I, Wolff JA.** (1997). *High expression of naked plasmid DNA in muscles of young rodents.* Hum Mol Genet. 6, 1435-1443.
- Danos O.** (1999). *Vectorologie: orientations et progrès récents.* Médecine/Sciences. 15, 663-667
- de Paiva A, Poulain B, Lawrence GW, Shone CC, Tauc L, Dolly JO.** (1993). *A role for the interchain disulfide or its participating thiols in the internalization of botulinum neurotoxin A revealed by a toxin derivative that binds to ecto-acceptors and inhibits transmitter release intracellularly.* J Biol Chem. 268, 20838-20844.
- Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P, Herzfeldt B, Roos RP, et al.** (1993). *Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase.* Science. 261, 1047-1051.
- Dobrenis K, Joseph A, Rattazzi MC.** (1992). *Neuronal lysosomal enzyme replacement using fragment C of tetanus toxin.* Proc Natl Acad Sci U S A. 89, 2297-2301.
- Doh SG, Vahlsing HL, Hartikka J, Liang X, Manthorpe M.** (1997). *Spatial-temporal patterns of gene expression in mouse skeletal muscle after injection of lacZ plasmid DNA.* Gene Ther. 4, 648-663.
- Dolly JO, Black JD, Williams RS, Melling J.** (1984). *Acceptors for botulinum neurotoxin reside on motor nerve terminals and mediate its internalization.* Nature. 457-470
- Donovan JJ, Middlebrook JL.** (1986). *Ion-conducting channels produced by botulinum toxin in planar lipid membranes.* Biochemistry. 25, 2872-2876.
- Dore S, Krieger C, Kar S, Quirion R.** (1996). *Distribution and levels of insulin-like growth factor (IGF-I and IGF- II) and insulin receptor binding sites in the spinal cords of amyotrophic lateral sclerosis (ALS) patients.* Brain Res Mol Brain Res. 41, 128-133.
- Dunlop J, Lou Z, Zhang Y, McIlvain HB.** (1999). *Inducible expression and pharmacology of the human excitatory amino acid transporter 2 subtype of L-glutamate transporter.* Br J Pharmacol. 128, 1485-1490.
- Dupressoir T, Schlehofer JR.** (1999). *[Natural infection with adeno-associated viruses].* Ann Biol Clin (Paris). 57, 667-675.
- During MJ, Samulski RJ, Elsworth JD, Kaplitt MG, Leone P, Xiao X, Li J, Freese A, Taylor JR, Roth RH, Sladek JR, Jr., O'Malley KL, Redmond DE, Jr.** (1998). *In vivo expression of*

therapeutic human genes for dopamine production in the caudates of MPTP-treated monkeys using an AAV vector. Gene Ther. 5, 820-827.

Eisen A, Krieger C. (1993). *Pathogenic mechanisms in sporadic amyotrophic lateral sclerosis.* Can J Neurol Sci. 20, 286-296.

Elliott JL. (1999). *Experimental models of amyotrophic lateral sclerosis.* Neurobiol Dis. 6, 310-320.

Emsley P, Fotinou C, Black I, Fairweather NF, Charles IG, Watts C, Hewitt E, Isaacs NW. (2000). *The structures of the H(C) fragment of tetanus toxin with carbohydrate subunit complexes provide insight into ganglioside binding.* J Biol Chem. 275, 8889-8894.

Erdmann G, Wiegand H, Wellhoner HH. (1975). *Intraaxonal and extraaxonal transport of 125I-tetanus toxin in early local tetanus.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 290, 357-373.

Escrig E, Aliño S. (1997). *Terapia génica del cáncer.* Farm Clín. 14, 259-269

Evinger C, Erichsen JT. (1986). *Transsynaptic retrograde transport of fragment C of tetanus toxin demonstrated by immunohistochemical localization.* Brain Res. 380, 383-388.

Farreras-Rozman. (1996). *Estivill X. Genética y tratamiento. Farreras Rozman, Medicina interna, 13ª edición.* 1264-1272

Figueiredo DM, Hallewell RA, Chen LL, Fairweather NF, Dougan G, Savitt JM, Parks DA, Fishman PS. (1997). *Delivery of recombinant tetanus-superoxide dismutase proteins to central nervous system neurons by retrograde axonal transport.* Exp Neurol. 145, 546-554.

Figueiredo DM, Matthews CC, Parks DA, Fairweather NF, Dougan G, Wilt SG, Fishman PS. (2000). *Interaction of tetanus toxin derived hybrid proteins with neuronal cells.* J Nat Toxins. 9, 363-379.

Fink R, Heimer L. (1967). *Two methods for selective silver impregnation of degenerating axons and their synaptics endings in the central nervous system.* Brain Res. 4, 369-374

Fishman PS, Carrigan DR. (1987). *Retrograde transneuronal transfer of the C-fragment of tetanus toxin.* Brain Res. 406, 275-279.

Fishman PS, Carrigan DR. (1988). *Motoneuron uptake from the circulation of the binding fragment of tetanus toxin.* Arch Neurol. 45, 558-561.

Fishman PS, Savitt JM. (1989). *Transsynaptic transfer of retrogradely transported tetanus protein- peroxidase conjugates.* Exp Neurol. 106, 197-203.

- Fishman PS, Farrand DA, Halpern JL, Latham WC.** (1992). *A simplified method for the preparation of tetanus toxin binding fragment for neurobiology.* J Neurosci Methods. 42, 229-236.
- Flotte TR, Carter BJ.** (1995). *Adeno-associated virus vectors for gene therapy.* Gene Ther. 2, 357-362.
- Francis JW, Hosler BA, Brown RH, Jr., Fishman PS.** (1995). *CuZn superoxide dismutase (SOD-1):tetanus toxin fragment C hybrid protein for targeted delivery of SOD-1 to neuronal cells.* J Biol Chem. 270, 15434-15442.
- Gambale F, Montal M.** (1988). *Characterization of the channel properties of tetanus toxin in planar lipid bilayers.* Biophys J. 53, 771-783.
- García-Foncillas.** (1996). *Introducción a la terapia génica: aplicación al tratamiento del cáncer.* Tiempos médicos. 1, 113-124.
- Gaudette M, Hirano M, Siddique T.** (2000). *Current status of SOD1 mutations in familial amyotrophic lateral sclerosis.* Amyotroph Lateral Scler Other Motor Neuron Disord. 1, 83-89.
- Gendron NH, MacKenzie AE.** (1999). *Spinal muscular atrophy: molecular pathophysiology.* Curr Opin Neurol. 12, 137-142.
- Giehl KM, Tetzlaff W.** (1996). *BDNF and NT-3, but not NGF, prevent axotomy-induced death of rat corticospinal neurons in vivo.* Eur J Neurosci. 8, 1167-1175.
- Gill DM.** (1982). *Bacterial toxins: a table of lethal amounts.* Microbiological Reviews. 86-94
- Gimenez y Ribotta M, Revah F, Pradier L, Loquet I, Mallet J, Privat A.** (1997). *Prevention of motoneuron death by adenovirus-mediated neurotrophic factors.* J Neurosci Res. 48, 281-285.
- Glorioso J, Bender MA, Fink D, DeLuca N.** (1995). *Herpes simplex virus vectors.* Mol Cell Biol Hum Dis Ser. 5, 33-63
- Gonatas NK, Harper C, Mizutani T, Gonatas JO.** (1979). *Superior sensitivity of conjugates of horseradish peroxidase with wheat germ agglutinin for studies of retrograde axonal transport.* J Histochem Cytochem. 27, 728-734.
- Gotte M, von Mollard GF.** (1998). *A new beat for the SNARE drum.* Trends Cell Biol. 8, 215-218.
- Greitz T, Widen L, Asard PE.** (1973). *On the possibility of radionuclide labelling of nervous tissue.* Neuroradiology. 6, 113-120.

- Grunhaus A, Horwitz M.** (1992). *Adenoviruses as cloning vectors*. *Semin Virol.* 3, 237-252
- Gurney ME, Pu H, Chiu AY, Dal Canto MC, Polchow CY, Alexander DD, Caliendo J, Hentati A, Kwon YW, Deng HX, et al.** (1994). *Motor neuron degeneration in mice that express a human Cu,Zn superoxide dismutase mutation*. *Science.* 264, 1772-1775.
- Gurney ME, Fleck TJ, Himes CS, Hall ED.** (1998). *Riluzole preserves motor function in a transgenic model of familial amyotrophic lateral sclerosis*. *Neurology.* 50, 62-66.
- Gutierrez A, Lemoine N, Sikora K.** (1992). *Gene therapy for cancer*. *Lancet.* 339, 715-721
- Gutiérrez-Rivas.** (1999). *Historia y terminología*. Prous Science. (Barcelona): 3-11
- Habermann E, Dimpfel W.** (1973). *Distribution of 125 I-tetanus toxin and 125 I-toxoid in rats with generalized tetanus, as influenced by antitoxin*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 276, 327-340.
- Habermann E, Dreyer F, Bigalke H.** (1980). *Tetanus toxin blocks the neuromuscular transmission in vitro like botulinum A toxin*. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 311, 33-40.
- Hadano S, Hand CK, Osuga H, Yanagisawa Y, Otomo A, Devon RS, Miyamoto N, Showguchi-Miyata J, Okada Y, Singaraja R, Figlewicz DA, Kwiatkowski T, Hosler BA, Sagie T, Skaug J, Nasir J, Brown RH, Jr., Scherer SW, Rouleau GA, Hayden MR, Ikeda JE.** (2001). *A gene encoding a putative GTPase regulator is mutated in familial amyotrophic lateral sclerosis 2*. *Nat Genet.* 29, 166-173.
- Hahnen E, Schonling J, Rudnik-Schoneborn S, Zerres K, Wirth B.** (1996). *Hybrid survival motor neuron genes in patients with autosomal recessive spinal muscular atrophy: new insights into molecular mechanisms responsible for the disease*. *Am J Hum Genet.* 59, 1057-1065.
- Hall ZW, Sanes JR.** (1993). *Synaptic structure and development: the neuromuscular junction*. *Cell.* 72 Suppl, 99-121.
- Halpern JL, Habig WH, Neale EA, Stibitz S.** (1990). *Cloning and expression of functional fragment C of tetanus toxin*. *Infect Immun.* 58, 1004-1009.
- Halpern JL, Loftus A.** (1993). *Characterization of the receptor-binding domain of tetanus toxin*. *J Biol Chem.* 268, 11188-11192.
- Halpern JL, Neale EA.** (1995). *Neurospecific binding, internalization, and retrograde axonal transport*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 195, 221-241

- Hammond EN, Tetzlaff W, Mestres P, Giehl KM.** (1999). *BDNF, but not NT-3, promotes long-term survival of axotomized adult rat corticospinal neurons in vivo.* Neuroreport. 10, 2671-2675.
- Hay JC, Scheller RH.** (1997). *SNAREs and NSF in targeted membrane fusion.* Curr Opin Cell Biol. 9, 505-512.
- Helting TB, Zwisler O, Wiegandt H.** (1977). *Structure of tetanus toxin. II. Toxin binding to ganglioside.* J Biol Chem. 252, 194-198.
- Herreros J, Lalli G, Montecucco C, Schiavo G.** (2000). *Tetanus toxin fragment C binds to a protein present in neuronal cell lines and motoneurons.* J Neurochem. 74, 1941-1950.
- Herreros J, Ng T, Schiavo G.** (2001). *Lipid rafts act as specialized domains for tetanus toxin binding and internalization into neurons.* Mol Biol Cell. 12, 2947-2960.
- Hickman MA, Malone RW, Lehmann-Bruinsma K, Sih TR, Knoell D, Szoka FC, Walzem R, Carlson DM, Powell JS.** (1994). *Gene expression following direct injection of DNA into liver.* Hum Gene Ther. 5, 1477-1483.
- Hoch DH, Romero-Mira M, Ehrlich BE, Finkelstein A, DasGupta BR, Simpson LL.** (1985). *Channels formed by botulinum, tetanus, and diphtheria toxins in planar lipid bilayers: relevance to translocation of proteins across membranes.* Proc Natl Acad Sci U S A. 82, 1692-1696.
- Holmgren J, Elwing H, Fredman P, Svennerholm L.** (1980). *Polystyrene-adsorbed gangliosides for investigation of the structure of the tetanus-toxin receptor.* Eur J Biochem. 106, 371-379.
- Holzer E.** (1962). *Botulism durch inhalation.* Med Klinik. 1735-1738
- Horn AK, Buttner-Ennever JA.** (1990). *The time course of retrograde transsynaptic transport of tetanus toxin fragment C in the oculomotor system of the rabbit after injection into extraocular eye muscles.* Exp Brain Res. 81, 353-362
- Hughes R, Whaler BC.** (1962). *Influence of nerve-endings activity and of drugs on the rate of paralysis of rat diaphragm preparations by Clostridium botulinum type A toxin.* Journal of Physiology. 221-233
- Hurko O, Walsh FS.** (2000). *Novel drug development for amyotrophic lateral sclerosis.* J Neurol Sci. 180, 21-28.
- Kandel E, Schwartz J, Jessell T.** (2000). *Principles of Neural Science.* Appleton & Lange. San Diego

- Kao G, Chang L, Allen T.** (1996). *Use of targeted cationic liposomes in enhanced DNA delivery to cancer cells.* Cancer Gene Ther. 3, 250-256
- Kelly RM, Strick PL.** (2000). *Rabies as a transneuronal tracer of circuits in the central nervous system.* J Neurosci Methods. 103, 63-71.
- Kennedy PG, Steiner I.** (1993). *The use of herpes simplex virus vectors for gene therapy in neurological diseases.* Q J Med. 86, 697-702.
- Klivenyi P, Ferrante RJ, Matthews RT, Bogdanov MB, Klein AM, Andreassen OA, Mueller G, Wermer M, Kaddurah-Daouk R, Beal MF.** (1999). *Neuroprotective effects of creatine in a transgenic animal model of amyotrophic lateral sclerosis.* Nat Med. 5, 347-350.
- Kobbert C, Apps R, Bechmann I, Lanciego JL, Mey J, Thanos S.** (2000). *Current concepts in neuroanatomical tracing.* Prog Neurobiol. 62, 327-351.
- Kochanek S.** (1999). *Development of high-capacity adenoviral vectors for gene therapy.* Thromb Haemost. 82, 547-551.
- Kohn DB, Kantoff PW, Eglitis MA, McLachlin JR, Moen RC, Karson E, Zwiebel JA, Nienhuis A, Karlsson S, O'Reilly R, et al.** (1987). *Retroviral-mediated gene transfer into mammalian cells.* Blood Cells. 13, 285-298
- Kok AB.** (1997). *Ascorbate availability and neurodegeneration in amyotrophic lateral sclerosis.* Med Hypotheses. 48, 281-296.
- Kong J, Xu Z.** (1998). *Massive mitochondrial degeneration in motor neurons triggers the onset of amyotrophic lateral sclerosis in mice expressing a mutant SOD1.* J Neurosci. 18, 3241-3250.
- Kostic V, Jackson-Lewis V, de Bilbao F, Dubois-Dauphin M, Przedborski S.** (1997). *Bcl-2: prolonging life in a transgenic mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis.* Science. 277, 559-562.
- Kozaki S, Miki A, Kamata Y, Ogasawara J, Sakaguchi G.** (1989). *Immunological characterization of papain-induced fragments of Clostridium botulinum type A neurotoxin and interaction of the fragments with brain synaptosomes.* Infect Immun. 57, 2634-2639.
- Kreiss P, Bettan M, Crouzet J, Scherman D.** (1999). *Erythropoietin secretion and physiological effect in mouse after intramuscular plasmid DNA electrotransfer.* J Gene Med. 1, 245-250.

- Kristensson K, Olsson Y.** (1971). *Retrograde axonal transport of protein.* Brain Res. 29, 363-365
- Kryzhanovsky GN.** (1958). *Central nervous changes in experimental tetanus and the mode of action of the tetanus toxin. Communication I. Irradiation of the excitation on stimulating the tetanized limb.* Bulletin of Experimental Biological Medicine. 1456-1464
- Kuhn W, Muller T.** (1996). *The clinical potential of Deprenyl in neurologic and psychiatric disorders.* J Neural Transm Suppl. 48, 85-93
- Kurek JB, Radford AJ, Crump DE, Bower JJ, Feeney SJ, Austin L, Byrne E.** (1998). *LIF (AM424), a promising growth factor for the treatment of ALS.* J Neurol Sci. 160 Suppl 1, S106-113.
- Kuypers HG, Ugolini G.** (1990). *Viruses as transneuronal tracers.* Trends Neurosci. 13, 71-75.
- Lachmann RH, Efstathiou S.** (1999). *Use of herpes simplex virus type 1 for transgene expression within the nervous system.* Clin Sci (Lond). 96, 533-541.
- Lai EC, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinas DF, Kratz R, Murphy MF, Natter HM, Norris FH, Rudnicki SA.** (1997). *Effect of recombinant human insulin-like growth factor-I on progression of ALS. A placebo-controlled study. The North America ALS/IGF-I Study Group.* Neurology. 49, 1621-1630.
- Lalli G, Herreros J, Osborne SL, Montecucco C, Rossetto O, Schiavo G.** (1999). *Functional characterisation of tetanus and botulinum neurotoxins binding domains.* J Cell Sci. 112, 2715-2724.
- Lalli G, Schiavo G.** (2002). *Analysis of retrograde transport in motor neurons reveals common endocytic carriers for tetanus toxin and neurotrophin receptor p75^{NTR}.* J Cell Biol. 156, 233-240.
- Lange DJ, Felice KJ, Festoff BW, Gawel MJ, Gelinas DF, Kratz R, Lai EC, Murphy MF, Natter HM, Norris FH, Rudnicki S.** (1996). *Recombinant human insulin-like growth factor-I in ALS: description of a double-blind, placebo-controlled study. North American ALS/IGF-I Study Group.* Neurology. 47, S93-94; discussion S94-95.
- Lange DJ, Murphy PL, Diamond B, Appel V, Lai EC, Younger DS, Appel SH.** (1998). *Selegiline is ineffective in a collaborative double-blind, placebo-controlled trial for treatment of amyotrophic lateral sclerosis.* Arch Neurol. 55, 93-96.

- Latchman DS.** (1999). *Gene therapy with herpes simplex virus vectors.* Arch Immunol Ther Exp. 47, 335-340
- Latchman DS, Coffin RS.** (2000). *Viral vectors in the treatment of Parkinson's disease.* Mov Disord. 15, 9-17.
- Lazarovici P, Yavin E.** (1986). *Affinity-purified tetanus neurotoxin interaction with synaptic membranes: properties of a protease-sensitive receptor component.* Biochemistry. 7047-7054
- Lazo P.** (1996). *Terapia génica humana: tendencias y problemas.* Medicina Clínica. 106, 469-476
- Lefebvre S, Burglen L, Reboullet S, Clermont O, Burlet P, Viollet L, Benichou B, Cruaud C, Millasseau P, Zeviani M, et al.** (1995). *Identification and characterization of a spinal muscular atrophy- determining gene.* Cell. 80, 155-165.
- Lehn P.** (1993). [*General principles of the production and use of retroviral vectors*]. Pathol Biol (Paris). 41, 658-662.
- Lemichez E, Bomsel M, Devilliers G, vanderSpek J, Murphy JR, Lukianov EV, Olsnes S, Boquet P.** (1997). *Membrane translocation of diphtheria toxin fragment A exploits early to late endosome trafficking machinery.* Mol Microbiol. 23, 445-457.
- Lewis ME, Neff NT, Contreras PC, Stong DB, Oppenheim RW, Grebow PE, Vaught JL.** (1993). *Insulin-like growth factor-I: potential for treatment of motor neuronal disorders.* Exp Neurol. 124, 73-88.
- Li K, Welikson R, Vikstrom K, Leinwand L.** (1997). *Direct gene transfer into the mouse heart.* J Mol Cell Cardiol. 29, 1499-1504
- Li S, Huang L.** (2000). *Nonviral gene therapy: promises and challenges.* Gene Ther. 7, 31-34.
- Lindsay RM.** (1994). *Neurotrophic growth factors and neurodegenerative diseases: therapeutic potential of the neurotrophins and ciliary neurotrophic factor.* Neurobiol Aging. 15, 249-251.
- Ludolph AC, Riepe MW.** (1999). *Do the benefits of currently available treatments justify early diagnosis and treatment of amyotrophic lateral sclerosis? Arguments against.* Neurology. 53(8, S46-49; discussion S55-47.
- Manning KA, Erichsen JT, Evinger C.** (1990). *Retrograde transneuronal transport properties of fragment C of tetanus toxin.* Neuroscience. 34, 251-263

- Mathiesen I.** (1999). *Electroporation of skeletal muscle enhances gene transfer in vivo.* Gene Ther. 6, 508-514.
- Matsuda M, Sugimoto N, Ozutsumi K, Hirai T.** (1982). *Acute botulinum-like intoxication by tetanus neurotoxin in mice.* Biochem Biophys Res Commun. 104, 799-805.
- Matteoli M, Verderio C, Rossetto O, Iezzi N, Coco S, Schiavo G, Montecucco C.** (1996). *Synaptic vesicle endocytosis mediates the entry of tetanus neurotoxin into hippocampal neurons.* Proc Natl Acad Sci U S A. 93, 13310-13315.
- Matthews JC, Aslanian AM, McDonald KK, Yang W, Malandro MS, Novak DA, Kilberg MS.** (1997). *An expression system for mammalian amino acid transporters using a stably maintained episomal vector.* Anal Biochem. 254, 208-214.
- Matthews KE, Dev SB, Toneguzzo F, Keating A.** (1995). *Electroporation for gene therapy.* Methods Mol Biol. 48, 273-280
- Matthijs G, Schollen E, Legius E, Devriendt K, Goemans N, Kayserili H, Apak MY, Cassiman JJ.** (1996). *Unusual molecular findings in autosomal recessive spinal muscular atrophy.* J Med Genet. 33, 469-474.
- Maurice J.** (1995). *¿Una revolución? La vacunación por DNA.* Mundo científico. 15, 674-677
- McMahon HT, Ushkaryov YA, Edelmann L, Link E, Binz T, Niemann H, Jahn R, Sudhof TC.** (1993). *Cellubrevin is a ubiquitous tetanus-toxin substrate homologous to a putative synaptic vesicle fusion protein.* Nature. 364, 346-349.
- Meier TJ, Ho DY, Sapolsky RM.** (1997). *Increased expression of calbindin D28k via herpes simplex virus amplicon vector decreases calcium ion mobilization and enhances neuronal survival after hypoglycemic challenge.* J Neurochem. 69, 1039-1047.
- Meier TJ, Ho DY, Park TS, Sapolsky RM.** (1998). *Gene transfer of calbindin D28k cDNA via herpes simplex virus amplicon vector decreases cytoplasmic calcium ion response and enhances neuronal survival following glutamatergic challenge but not following cyanide.* J Neurochem. 71, 1013-1023.
- Mellanby J, Green J.** (1981). *How does tetanus toxin act?* Neuroscience. 6, 281-300
- Menestrina G, Forti S, Gambale F.** (1989). *Interaction of tetanus toxin with lipid vesicles. Effects of pH, surface charge, and transmembrane potential on the kinetics of channel formation.* Biophys J. 55, 393-405.

- Miller AD.** (1992). *Human gene therapy comes of age.* Nature. 357, 455-460.
- Miller RG, Moore DH, 2nd, Gelinás DF, Dronsky V, Mendoza M, Barohn RJ, Bryan W, Ravits J, Yuen E, Neville H, Ringel S, Bromberg M, Petajan J, Amato AA, Jackson C, Johnson W, Mandler R, Bosch P, Smith B, Graves M, Ross M, Sorenson EJ, Kelkar P, Parry G, Olney R.** (2001). *Phase III randomized trial of gabapentin in patients with amyotrophic lateral sclerosis.* Neurology. 56, 843-848.
- Miller RJ, Ragsdale CW.** (2000). *Transforming growth factor-beta: death takes a holiday.* Nat Neurosci. 3, 1061-1062.
- Mir LM, Bureau MF, Rangara R, Schwartz B, Scherman D.** (1998). *Long-term, high level in vivo gene expression after electric pulse-mediated gene transfer into skeletal muscle.* C R Acad Sci III. 321, 893-899.
- Mir LM, Bureau MF, Gehl J, Rangara R, Rouy D, Caillaud JM, Delaere P, Branellec D, Schwartz B, Scherman D.** (1999). *High-efficiency gene transfer into skeletal muscle mediated by electric pulses.* Proc Natl Acad Sci U S A. 96, 4262-4267.
- Mitchell JD** (2000). *Guidelines in motor neurone disease (MND)/amyotrophic lateral sclerosis (ALS)--from diagnosis to patient care.* J Neurol; 246 Suppl 6:7-12
- Mochida S, Poulain B, Weller U, Habermann E, Tauc L.** (1989). *Light chain of tetanus toxin intracellularly inhibits acetylcholine release at neuro-neuronal synapses, and its internalization is mediated by heavy chain.* FEBS Lett. 253, 47-51.
- Mohajeri MH, Figlewicz DA, Bohn MC.** (1999). *Intramuscular grafts of myoblasts genetically modified to secrete glial cell line-derived neurotrophic factor prevent motoneuron loss and disease progression in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis.* Hum Gene Ther. 10, 1853-1866.
- Monahan PE, Samulski RJ.** (2000). *AAV vectors: is clinical success on the horizon?* Gene Ther. 7, 24-30.
- Montal MS, Blewitt R, Tomich JM, Montal M.** (1992). *Identification of an ion channel-forming motif in the primary structure of tetanus and botulinum neurotoxins.* FEBS Lett. 313, 12-18.
- Montecucco C.** (1986). *How do tetanus and botulinum toxins bind to neuronal membranes?* Trends Biochem Sci. 11, 315-317

- Montecucco C, Schiavo G, Gao Z, Bauerlein E, Boquet P, DasGupta BR.** (1988). *Interaction of botulinum and tetanus toxins with the lipid bilayer surface.* Biochem J. 251, 379-383.
- Montecucco C, Papini E, Schiavo G.** (1991). *Molecular models of toxin membrane translocation. In: A sourcebook of bacterial protein toxins.* London: Academic
- Montecucco C, Papini E, Schiavo G.** (1994). *Bacterial protein toxins penetrate cells via a four-step mechanism.* FEBS Lett. 346, 92-98.
- Montecucco C, Schiavo G.** (1995). *Structure and function of tetanus and botulinum neurotoxins.* Q Rev Biophys. 28, 423-472.
- Morris AD.** (2001). *The reality of type 2 diabetes treatment today.* Int J Clin Pract Suppl. 32-35.
- Morris NP, Consiglio E, Kohn LD, Habig WH, Hardegree MC, Helting TB.** (1980). *Interaction of fragments B and C of tetanus toxin with neural and thyroid membranes and with gangliosides.* J Biol Chem. 255, 6071-6076.
- Mulligan R.** (1993). *The basic science of gene therapy.* Science. 260, 926-932
- Muramatsu T, Nakamura A, Park HM.** (1998). *In vivo electroporation: a powerful and convenient means of nonviral gene transfer to tissues of living animals (Review).* Int J Mol Med. 1, 55-62.
- Nauta W, Gyax P.** (1954). *Silver impregnation of degenerating axons in the CNS: a modified technique.* Stain Technol. 29, 91-93
- Norgren RB, Jr., Lehman MN.** (1998). *Herpes simplex virus as a transneuronal tracer.* Neurosci Biobehav Rev. 22, 695-708.
- Novelli G, Semprini S, Capon F, Dallapiccola B.** (1997). *A possible role of NAIP gene deletions in sex-related spinal muscular atrophy phenotype variation.* Neurogenetics. 1, 29-30.
- Ono S, Imai T, Igarashi A, Shimizu N, Nakagawa H, Hu J.** (1999). *Decrease in the ciliary neurotrophic factor of the spinal cord in amyotrophic lateral sclerosis.* Eur Neurol. 42, 163-168
- Otero Siliceo E, Arriada-Mendicoa N, Balderrama J.** (1998). *Juvenile familial amyotrophic lateral sclerosis: four cases with long survival.* Dev Med Child Neurol. 40, 425-428.
- Palu G, Parolin C, Takeuchi Y, Pizzato M.** (2000). *Progress with retroviral gene vectors.* Rev Med Virol. 10, 185-202.
- Papini E, Sandona D, Rappuoli R, Montecucco C.** (1988). *On the membrane translocation of diphtheria toxin: at low pH the toxin induces ion channels on cells.* Embo J. 7, 3353-3359.

- Parton RG, Ockleford CD, Critchley DR.** (1987). *A study of the mechanism of internalisation of tetanus toxin by primary mouse spinal cord cultures.* J Neurochem. 49, 1057-1068.
- Parton RG, Ockleford CD, Critchley DR.** (1988). *Tetanus toxin binding to mouse spinal cord cells: an evaluation of the role of gangliosides in toxin internalization.* Brain Res. 475, 118-127.
- Payling-Wring G.** (1955). *The neurotoxins of the Clostridium botulinum and Clostridium tetani.* Pharmacological Reviews. 413-465
- Penner R, Neher E, Dreyer F.** (1986). *Intracellularly injected tetanus toxin inhibits exocytosis in bovine adrenal chromaffin cells.* Nature. 324, 76-78.
- Pierce EJ, Davison MD, Parton RG, Habig WH, Critchley DR.** (1986). *Characterization of tetanus toxin binding to rat brain membranes. Evidence for a high-affinity proteinase-sensitive receptor.* Biochem J. 236, 845-852.
- Ponomarev AW.** (1928). *Zur frage der pathogenese des tetanus und des fortbewegungsmechanismus des Tetanustoxin entlang der nerven.* Z. Ges. Exp. Med. 93-106
- Poulain B, Tauc L, Maisey EA, Wadsworth JD, Mohan PM, Dolly JO.** (1988). *Neurotransmitter release is blocked intracellularly by botulinum neurotoxin, and this requires uptake of both toxin polypeptides by a process mediated by the larger chain.* Proc Natl Acad Sci U S A. 85, 4090-4094.
- Poulain B, Doussau F, Colosante C, Deloye F, Molgó J.** (1997). *Cellular and molecular mode of action of botulinum and tetanus neurotoxins.* In: *Advances in organ biology.* Londres
- Price DL, Griffin J, Young A, Peck K, Stocks A.** (1975). *Tetanus toxin: direct evidence for retrograde intraaxonal transport.* Science. 945-947
- Raz E, Carson DA, Parker SE, Parr TB, Abai AM, Aichinger G, Gromkowski SH, Singh M, Lew D, Yankauckas MA, et al.** (1994). *Intradermal gene immunization: the possible role of DNA uptake in the induction of cellular immunity to viruses.* Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 9519-9523.
- Reljanovic M, Reichel G, Rett K, Lobisch M, Schuette K, Moller W, Tritschler HJ, Mehnert H.** (1999). *Treatment of diabetic polyneuropathy with the antioxidant thioctic acid (alpha-lipoic acid): a two year multicenter randomized double-blind placebo-controlled trial (ALADIN II).* Alpha Lipoic Acid in Diabetic Neuropathy. Free Radic Res. 31, 171-179.

- Robbins PD, Ghivizzani SC.** (1998). *Viral vectors for gene therapy*. Pharmacol Ther. 80, 35-47.
- Rosen DR, Siddique T, Patterson D, Figlewicz DA, Sapp P, Hentati A, Donaldson D, Goto J, O'Regan JP, Deng HX, et al.** (1993). *Mutations in Cu/Zn superoxide dismutase gene are associated with familial amyotrophic lateral sclerosis*. Nature. 362, 59-62.
- Rothman JE, Warren G.** (1994). *implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics*. Curr Biol. 220-233
- Rothstein JD, Van Kammen M, Levey AI, Martin LJ, Kuncl RW.** (1995). *Selective loss of glial glutamate transporter GLT-1 in amyotrophic lateral sclerosis*. Ann Neurol. 38, 73-84.
- Rowland LP.** (1996). *Controversies about amyotrophic lateral sclerosis*. Neurologia. 11 Suppl 5, 72-74.
- Sagot Y, Dubois-Dauphin M, Tan SA, de Bilbao F, Aebischer P, Martinou JC, Kato AC.** (1995). *Bcl-2 overexpression prevents motoneuron cell body loss but not axonal degeneration in a mouse model of a neurodegenerative disease*. J Neurosci. 15, 7727-7733.
- Sahenk Z, Seharaseyon J, Mendell JR, Burghes AH.** (1993). *Gene delivery to spinal motor neurons*. Brain Res. 606, 126-129.
- Salmons B, Gunzburg WH.** (1993). *Targeting of retroviral vectors for gene therapy*. Hum Gene Ther. 4, 129-141.
- Sandvig K, Olsnes S.** (1988). *Diphtheria toxin-induced channels in Vero cells selective for monovalent cations*. J Biol Chem. 263, 12352-12359.
- Sanes JR, Lichtman JW.** (1999). *Development of the vertebrate neuromuscular junction*. Annu Rev Neurosci. 22, 389-442
- Saravolac EG, Ludkovski O, Skirrow R, Ossanlou M, Zhang YP, Giesbrecht C, Thompson J, Thomas S, Stark H, Cullis PR, Scherrer P.** (2000). *Encapsulation of plasmid DNA in stabilized plasmid-lipid particles composed of different cationic lipid concentration for optimal transfection activity*. J Drug Target. 7, 423-437
- Satkauskas S, Bureau MF, Mahfoudi A, Mir LM.** (2001). *Slow accumulation of plasmid in muscle cells: supporting evidence for a mechanism of DNA uptake by receptor-mediated endocytosis*. Mol Ther. 4, 317-323.

- Schiavo G, Papini E, Genna G, Montecucco C.** (1990). *An intact interchain disulfide bond is required for the neurotoxicity of tetanus toxin.* Infect Immun. 4136-4141
- Schiavo G, Ferrari G, Rossetto O, Montecucco C.** (1991). *Specific cross-linking of tetanus toxin to a protein of NGF-differentiated PC12 cells.* FEBS Lett. 227-230
- Schiavo G, Benfenati F, Poulain B, Rossetto O, Polverino de Laureto P, DasGupta BR, Montecucco C.** (1992a). *Tetanus and botulinum-B neurotoxins block neurotransmitter release by proteolytic cleavage of synaptobrevin.* Nature. 359, 832-835.
- Schiavo G, Poulain B, Rossetto O, Benfenati F, Tauc L, Montecucco C.** (1992b). *Tetanus toxin is a zinc protein and its inhibition of neurotransmitter release and protease activity depend on zinc.* Embo J. 11, 3577-3583.
- Schiavo G, Matteoli M, Montecucco C.** (2000). *Neurotoxins affecting neuroexocytosis.* Physiol Rev. 80, 717-766.
- Schmid MF, Robinson JP, DasGupta BR.** (1993). *Direct visualization of botulinum neurotoxin-induced channels in phospholipid vesicles.* Nature. 364, 827-830.
- Schwab ME, Suda K, Thoenen H.** (1979). *Selective retrograde transsynaptic transfer of a protein, tetanus toxin, subsequent to its retrograde axonal transport.* J Cell Biol. 82, 798-810.
- Schweizer FE, Betz H, Augustine GJ.** (1995). *From vesicle docking to endocytosis: intermediate reactions of exocytosis.* Neuron. 14, 689-696.
- Shapiro RE, Specht CD, Collins BE, Woods AS, Cotter RJ, Schnaar RL.** (1997). *Identification of a ganglioside recognition domain of tetanus toxin using a novel ganglioside photoaffinity ligand.* J Biol Chem. 272, 30380-30386.
- Shaw PJ.** (2001). *Genetic inroads in familial ALS.* Nat Genet. 29, 103-104.
- Shone CC, Hambleton P, Melling J.** (1985). *Inactivation of Clostridium botulinum type A neurotoxin by trypsin and purification of two tryptic fragments. Proteolytic action near the COOH-terminus of the heavy subunit destroys toxin-binding activity.* Eur J Biochem. 151, 75-82.
- Shone CC, Hambleton P, Melling J.** (1987). *A 50-kDa fragment from the NH₂-terminus of the heavy subunit of Clostridium botulinum type A neurotoxin forms channels in lipid vesicles.* Eur J Biochem. 167, 175-180.

- Sikes ML, O'Malley BW, Jr., Finegold MJ, Ledley FD.** (1994). *In vivo gene transfer into rabbit thyroid follicular cells by direct DNA injection.* Hum Gene Ther. 5, 837-844.
- Simons K, Toomre D.** (2000). *Lipid rafts, and signal transduction.* Nat Rev Mol Cell Biol. 31-39
- Simpson LL.** (1982). *The interaction between aminoquinolines and presynaptically acting neurotoxins.* J Pharmacol Exp Ther. 222, 43-48.
- Simpson LL.** (1983). *Ammonium chloride and methylamine hydrochloride antagonize clostridial neurotoxins.* J Pharmacol Exp Ther. 225, 546-552.
- Simpson LL.** (1989). *Botulinum neurotoxin and Tetanus toxin.* San Diego, CA: Academic
- Simpson LL, Coffield JA, Bakry N.** (1994). *Inhibition of vacuolar adenosine triphosphatase antagonizes the effects of clostridial neurotoxins but not phospholipase A2 neurotoxins.* J Pharmacol Exp Ther. 269, 256-262.
- Snyder RO.** (1999). *Adeno-associated virus-mediated gene delivery.* J Gene Med. 1, 166-175.
- Sollner T, Bennett M, Whiteheart SW, Scheller RH, Rothman JE.** (1993a). *A protein assembly-disassembly pathway in vitro that may correspond to sequential steps of synaptic vesicle docking, activation and fusion.* Cell. 409-418
- Sollner T, Whiteheart SW, Brunner M, Erdjument-Bromage H, Geromanos S, Temps P, Rothman JE.** (1993b). *SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion.* Nature. 318-324
- Staub GC, Walton KM, Schnaar RL, Nichols T, Baichwal R, Sandberg K, Rogers TB.** (1986). *Characterization of the binding and internalization of tetanus toxin in a neuroblastoma hybrid cell line.* J Neurosci. 6, 1443-1451.
- Stockel K, Schwab M, Thoenen H.** (1975). *Comparison between the retrograde axonal transport of nerve growth factor and tetanus toxin in motor, sensory and adrenergic neurons.* Brain Res. 99, 1-16.
- Sudhof TC.** (1995). *The synaptic vesicle cycle: a cascade of protein-protein interactions.* Nature. 375, 645-653.
- Szczudlik A, Tomik B, Slowik A, Kasprzyk K.** (1998). *[Assessment of the efficacy of treatment with pimozide in patients with amyotrophic lateral sclerosis. Introductory notes].* Neurol Neurochir Pol. 32, 821-829.

- Takehara T, Hayashi N, Yamamoto M, Miyamoto Y, Fusamoto H, Kamada T.** (1996). *In vivo gene transfer and expression in rat stomach by submucosal injection of plasmid DNA*. Hum Gene Ther. 7, 589-593.
- Torres-Aleman I, Barrios V, Berciano J.** (1998). *The peripheral insulin-like growth factor system in amyotrophic lateral sclerosis and in multiple sclerosis*. Neurology. 50, 772-776.
- Trojanowski JQ, Gonatas JO, Gonatas NK.** (1982). *Horseradish peroxidase (HRP) conjugates of cholera toxin and lectins are more sensitive retrogradely transported markers than free HRP*. Brain Res. 231, 33-50.
- Trotti D, Rolfs A, Danbolt NC, Brown RH, Jr., Hediger MA.** (1999). *SOD1 mutants linked to amyotrophic lateral sclerosis selectively inactivate a glial glutamate transporter*. Nat Neurosci. 2, 427-433.
- Tu PH, Gurney ME, Julien JP, Lee VM, Trojanowski JQ.** (1997). *Oxidative stress, mutant SOD1, and neurofilament pathology in transgenic mouse models of human motor neuron disease*. Lab Invest. 76, 441-456.
- Ugolini G.** (1995a). *Specificity of rabies virus as a transneuronal tracer of motor networks: transfer from hypoglossal motoneurons to connected second- order and higher order central nervous system cell groups*. J Comp Neurol. 356, 457-480.
- Ugolini G.** (1995b). *Transneuronal tracing with alpha-herpesviruses: a review of the methodology*. In viral vectors. Ed. Academic Press. San Diego, CA
- Umene K.** (1999). *Mechanism and application of genetic recombination in herpesviruses*. Rev Med Virol. 9, 171-182.
- Vallee RB, Bloom GS.** (1991). *Mechanisms of fast and slow axonal transport*. Annu Rev Neurosci. 14, 59-92
- Varmus H.** (1988). *Retroviruses*. Science. 240, 1427-1435.
- Vilquin JT, Kennel PF, Paturneau-Jouas M, Chapdelaine P, Boissel N, Delaere P, Tremblay JP, Scherman D, Fiszman MY, Schwartz K.** (2001). *Electrotransfer of naked DNA in the skeletal muscles of animal models of muscular dystrophies*. Gene Ther. 8, 1097-1107.
- Wan XC, Trojanowski JQ, Gonatas JO.** (1982). *Cholera toxin and wheat germ agglutinin conjugates as neuroanatomical probes: their uptake and clearance, transganglionic and retrograde transport and sensitivity*. Brain Res. 243, 215-224.

- Wang II, Huang II.** (2000). *Adenovirus technology for gene manipulation and functional studies.* Drug Discov Today. 5, 10-16.
- Waragai M.** (1997). *MRI and clinical features in amyotrophic lateral sclerosis.* Neuroradiology. 39, 847-851.
- Weber M, Möller K, Welzeck M, Schorr J.** (1995). *Effect of lipopolysaccharide on transfection efficiency in eukaryotic cells.* BioTechniques. 19, 930-940
- Weller U, Taylor CF, Habermann E.** (1986). *Quantitative comparison between tetanus toxin, some fragments and toxoid for binding and axonal transport in the rat.* Toxicol. 24, 1055-1063
- Weller U, Dauzenroth ME, Gansel M, Dreyer F.** (1991). *Cooperative action of the light chain of tetanus toxin and the heavy chain of botulinum toxin type A on the transmitter release of mammalian motor endplates.* Neurosci Lett. 122, 132-134.
- Wellhoner HH, Seib UC, Hensel B.** (1973). *Local tetanus in cats: the influence of neuromuscular activity on spinal distribution of 125 I labelled tetanus toxin.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 276, 387-394.
- Wellhoner HH.** (1992). *Tetanus and botulinum neurotoxins.* In: *Hand-book of experimental pharmacology.* Herker, H. Hucho, F. Berlin: Springer-Verlag
- Wellhoner NH.** (1982). *Tetanus neurotoxin.* Rev Physiol Biochem Pharmacol. 93, 1-68
- Wickham TJ.** (2000). *Targeting adenovirus.* Gene Ther. 7, 110-114.
- Williamson LC, Neale EA.** (1994). *Bafilomycin A1 inhibits the action of tetanus toxin in spinal cord neurons in cell culture.* J Neurochem. 63, 2342-2345.
- Wolff JA, Malone RW, Williams P, Chong W, Acsadi G, Jani A, Felgner PL.** (1990). *Direct gene transfer into mouse muscle in vivo.* Science. 247, 1465-1468.
- Wolff JA, Ludtke JJ, Acsadi G, Williams P, Jani A.** (1992). *Long-term persistence of plasmid DNA and foreign gene expression in mouse muscle.* Hum Mol Genet. 1, 363-369.
- Yamasaki S, Baumeister A, Binz T, Blasi J, Link E, Cornille F, Roques B, Fykse EM, Sudhof TC, Jahn R, et al.** (1994a). *Cleavage of members of the synaptobrevin/VAMP family by types D and F botulinum neurotoxins and tetanus toxin.* J Biol Chem. 269, 12764-12772.
- Yamasaki S, Hu Y, Binz T, Kalkuhl A, Kurazono H, Tamura T, Jahn R, Kandel E, Niemann H.** (1994b). *Synaptobrevin/vesicle-associated membrane protein (VAMP) of Aplysia californica:*

structure and proteolysis by tetanus toxin and botulinical neurotoxins type D and F. Proc Natl Acad Sci U S A. 91, 4688-4692.

Yang Y, Hentati A, Deng HX, Dabbagh O, Sasaki T, Hirano M, Hung WY, Ouahchi K, Yan J, Azim AC, Cole N, Gascon G, Yagmour A, Ben-Hamida M, Pericak-Vance M, Hentati F, Siddique T. (2001). *The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis.* Nat Genet. 29, 160-165.

Yavin E, Nathan A. (1986). *Tetanus toxin receptors on nerve cells contain a trypsin-sensitive component.* Eur J Biochem. 154, 403-407.

Zhang G, Budker V, Williams P, Subbotin V, Wolff JA. (2001). *Efficient expression of naked dna delivered intraarterially to limb muscles of nonhuman primates.* Hum Gene Ther. 12, 427-438.

Zuidam NJ, Barenholz Y. (1999). *Characterization of DNA-lipid complexes commonly used for gene delivery.* Int J Pharm. 183, 43-46.