

Summary

Spinal muscular atrophy (SMA) is one of the most common fatal neuromuscular disorders of genetic origin. Characterised by α -motor neuron (MN) degeneration, clinical symptoms of SMA comprise symmetrical weakness and paralysis of proximal voluntary muscles. Although SMA is caused by biallelic loss-of-function variants in the survival motor neuron 1 (*SMN1*) gene, disease severity is mainly determined by the copy number of *SMN2*. Due to its differential splicing, *SMN2*, a nearly identical copy gene of *SMN1* encoding for the same protein in humans, produces significantly lower amounts of functional SMN and thus can only partially compensate for the loss of *SMN1*. Although currently approved treatment approaches – aiming to restore SMN levels – show powerful results, they are not able to fully ameliorate the disease phenotype. Therefore, targeting of further, SMN-independent pathways in combination with the approved therapies might enhance therapeutic outcome.

To identify new therapeutic avenues, this work is divided in two highly interconnected parts. In part I, we aimed to make use of the work on SMA protective modifiers and their potential in a combinatorial treatment with the approved compounds, also looking into affected pathways and the possibility to identify new treatment targets. In part II, we aimed to shed light onto the electrophysiological deficits previously reported in SMA that could potentially be targeted with the combinatorial treatments or lead to the identification of additional targetable pathways and mechanisms.

To date, multiple genetic modifiers of SMA have been described in humans and in various disease models. In phenotypically discordant SMA families an increased expression of plastin 3 (*PLS3*) in asymptomatic female individuals was previously identified. Although numerous studies showed favourable effects of PLS3 overexpression, pathways through which PLS3 exerts its protective function remain elusive. To understand the underlying molecular mechanism behind the protective effects of PLS3 overexpression, we performed analysis of the PLS3 interactome and identified stromal interaction molecule 1 (STIM1) as a putative PLS3 interactor. STIM1, acting as a calcium (Ca^{2+}) sensor, is the master regulator of intracellular calcium store refilling following depletion, through the store-operated calcium entry (SOCE) pathway. Thus, we hypothesised that PLS3 may counteract the SMA phenotype through calcium homeostasis, via its crosstalk with STIM1 and SOCE. In depth mechanistic analysis revealed tissue-dependent differential regulation of STIM1 in SMA. We demonstrated loss of STIM1 in heavily affected tissues and primary MNs of SMA mice and SMN-deficient C2C12 myoblasts. Overexpression of PLS3 ameliorated reduced STIM1 levels in MNs, heart and *transversus abdominis* muscle of SMA mice. Interestingly, SMA-resistant *gastrocnemius* (GC) muscles displayed an elevation in STIM1, which was not altered by overexpression of PLS3. Despite altered STIM1 levels, a proximity ligation assay unveiled a significant degree of basal interaction between STIM1 and its major calcium release-activated calcium channel, ORA1 in murine SMA spinal cords, GC muscles and cultured MNs. Unexpectedly, PLS3 overexpression led to a prominent downregulation of this interaction in spinal

cords and GC muscles of SMA mice, but not in MNs *in vitro*. Taken together, based on quantitative profiling of STIM1 abundance and its basal interaction with ORAI1, we speculate a highly saturated SOCE system in severely affected tissues of SMA mice. PLS3 overexpression appears to ameliorate this phenomenon by restoration of STIM1 levels or reduction of the STIM1-ORAI1 interaction, in line with our initial hypothesis on the regulatory role of PLS3 in intracellular calcium homeostasis. The complexity of this pathway implies the necessity of a detailed deciphering of SOCE in SMA condition and the role of PLS3 in the future.

Multiple reports demonstrated disturbed electrophysiological properties, i.e. increased intrinsic excitability of MNs in various SMA models. Having been provided with a consistent measure of MN dysfunction and model severity, the central aim of the second part of the thesis was to perform electrophysiological characterisation of our SMA MN culture model, and to define SMN dependency of arising electrophysiological deficits. By doing so, we additionally intended to generate a reliably phenotypic MN culture system for future undertakings, such as studying novel therapeutics.

Contrary to previous findings using different SMA models, we observed no conclusive electrophysiological disease phenotype in SMA MNs, due to the fact that embryonic MNs of the applied Taiwanese SMA mouse model still produce sufficient amount of SMN protein (40-50% of controls). There appears to be a precise threshold of SMN above which such disturbances do not arise. By reducing SMN to 20-25% of controls by lentiviral *shSmn* delivery, the previously suggested hyperexcitability immediately became prominent, recapitulating findings of others, and providing us with a severely phenotypic system for future experiments. We observed no alteration in spontaneous neuronal network activity of SMN-deficient MNs.

Previous studies demonstrated disturbed abundance and clustering of $Ca_v2.2$ channels and a consequent disrupted intracellular calcium signalling in SMA, which was ameliorated by PLS3 overexpression. Based on our current study, identifying $Ca_v2.2$ as a PLS3 interacting protein, future electrophysiological studies using PLS3 overexpressing SMA MNs may shed light onto a potential (protective) role of PLS3 in terms of neuronal function and excitability upon SMN loss.

In summary, our findings contribute to a better understanding of disturbed calcium regulatory pathways in the course of SMA and provide hints of a modulatory role of PLS3 in intracellular calcium homeostasis. It appears imperative to conduct further research to comprehensively understand the underlying molecular mechanisms.

Zusammenfassung

Spinale Muskelatrophie (SMA) ist eine der häufigsten tödlichen neuromuskulären Erkrankungen genetischen Ursprungs. Kennzeichnend für SMA ist die Degeneration der α -Motorneuronen (MN). Die klinischen Symptome von SMA umfassen eine beidseitige Schwäche und Lähmung der proximalen Muskeln. Obwohl SMA durch biallelische Funktionsverlustvarianten im Gen survival motor neuron 1 (*SMN1*) verursacht wird, wird die Schwere der Erkrankung hauptsächlich durch die Kopienzahl von *SMN2* bestimmt. Neben *SMN1* kodiert auch das Gen *SMN2* beim Menschen für dasselbe SMN Protein. Aufgrund seines unterschiedlichen Spleißens produziert *SMN2* allerdings deutlich geringere Mengen an funktionellem SMN und kann somit den Verlust von *SMN1* nur teilweise ausgleichen. Obwohl die derzeit zugelassenen Behandlungsansätze, die auf die Wiederherstellung des SMN-Spiegels abzielen, gute Ergebnisse zeigen, sind sie nicht in der Lage den Phänotyp der Krankheit vollständig zu beheben. Daher könnte die gezielte Beeinflussung weiterer, SMN-unabhängiger Signalwege in Kombination mit den zugelassenen Therapien den therapeutischen Erfolg verbessern.

Um neue therapeutische Wege zu finden, ist diese Doktorarbeit in zwei eng miteinander verknüpfte Teile gegliedert. In Teil I zielten wir darauf ab, die Arbeiten zu den schützenden Modifikatoren der SMA und ihr Potenzial für eine kombinatorische Behandlung mit den zugelassenen Wirkstoffen zu nutzen und dabei auch die betroffenen Signalwege und die Möglichkeit zur Identifizierung neuer Behandlungsziele zu untersuchen. In Teil II wollten wir die elektrophysiologischen Defizite beleuchten, die zuvor bei SMA berichtet wurden und die möglicherweise mit den kombinatorischen Behandlungen angegangen werden können oder zur Identifizierung zusätzlicher zielgerichteter Signalwege und Mechanismen führen.

Bislang wurden beim Menschen und in verschiedenen Krankheitsmodellen mehrere genetische Modifikatoren von SMA beschrieben. In phänotypisch diskordanten SMA-Familien wurde zuvor eine erhöhte Expression von plastin 3 (*PLS3*) bei asymptomatischen weiblichen Personen festgestellt. Obwohl zahlreiche Studien die positiven Auswirkungen einer Überexpression von *PLS3* gezeigt haben, sind die Wege über die *PLS3* seine schützende Funktion ausübt nach wie vor ungeklärt. Um den zugrundeliegenden molekularen Mechanismus hinter der schützenden Wirkung von *PLS3*-Überexpression zu verstehen, führten wir eine Analyse des *PLS3*-Interaktoms durch und identifizierten das stromal interaction molecule 1 (*STIM1*) als einen mutmaßlichen *PLS3*-Interaktor. *STIM1* fungiert als Kalzium-(Ca^{2+})-Sensor und ist der Hauptregulator für die Wiederauffüllung der intrazellulären Kalziumspeicher nach einer Entleerung über den store-operated calcium entry (SOCE). Daher stellten wir die Hypothese auf, dass *PLS3* dem SMA-Phänotyp durch eine Kalzium-Homöostase entgegenwirken könnte, die über sein Zusammenspiel mit *STIM1* und SOCE erfolgt. Eine eingehende mechanistische Analyse ergab eine gewebeabhängige unterschiedliche Regulierung von *STIM1* bei SMA. Wir konnten einen Verlust von *STIM1* in stark betroffenen Geweben und primären MNs von SMA-Mäusen und *SMN*-

defizienten C2C12-Myoblasten nachweisen. Die Überexpression von PLS3 verbesserte den verringerten STIM1-Spiegel in MNs, im Herzen und im *Musculus transversus abdominis* von SMA-Mäusen. Interessanterweise wiesen SMA-resistente *Gastrocnemius*-Muskeln (GC) einen erhöhten STIM1-Spiegel auf, der sich durch die Überexpression von PLS3 nicht veränderte.

Trotz des veränderten STIM1-Spiegels zeigte ein Proximity-Ligationstest ein signifikantes Ausmaß an basaler Interaktion zwischen STIM1 und dem wichtigsten durch Kalziumfreisetzung aktivierten Kalziumkanal, ORAI1, in SMA-Rückenmark und GC-Muskeln von Mäusen sowie in kultivierten MNs. Unerwarteterweise führte die Überexpression von PLS3 zu einer deutlichen Herabregulierung dieser Interaktion im Rückenmark und in den GC-Muskeln von SMA-Mäusen, aber nicht in den MNs *in vitro*. Insgesamt vermuten wir auf der Grundlage der quantitativen Profilierung des STIM1-Spiegels und derer basalen Interaktion mit ORAI1 ein hochgradig gesättigtes SOCE-System in schwer betroffenen Geweben von SMA-Mäusen. Die Überexpression von PLS3 scheint dieses Phänomen durch die Wiederherstellung des STIM1-Spiegels oder die Verringerung der STIM1-ORAI1-Interaktion zu verbessern, was mit unserer ursprünglichen Hypothese über die regulatorische Rolle von PLS3 bei der intrazellulären Kalzium-Homöostase übereinstimmt. Die Komplexität dieses Signalwegs macht eine detaillierte Entschlüsselung des SOCE im SMA-Zustand und der Rolle von PLS3 in Zukunft erforderlich. In mehreren Berichten wurden veränderte elektrophysiologische Eigenschaften, d.h. eine erhöhte intrinsische Erregbarkeit von MNs in verschiedenen SMA-Modellen nachgewiesen. Nachdem wir über ein konsistentes Maß für die MN-Dysfunktion und den Schweregrad des Modells verfügten, war das zentrale Ziel des zweiten Teils der Arbeit die elektrophysiologische Charakterisierung unseres SMA-MN-Kulturmodells und die Definition der SMN-Abhängigkeit der auftretenden elektrophysiologischen Defizite. Auf diese Weise wollten wir zusätzlich ein zuverlässiges phänotypisches MN-Kultursystem für zum Beispiel zukünftige Untersuchung neuer Therapeutika generieren.

Im Gegensatz zu früheren Befunden in verschiedenen SMA-Modellen beobachteten wir keinen eindeutigen elektrophysiologischen Krankheitsphänotyp in SMA-MNs, was darauf zurückzuführen ist, dass embryonale MNs des verwendeten taiwanesischen SMA-Mausmodells immer noch ausreichende Mengen an SMN-Protein produzieren (40-50 % der Kontrollen). Es scheint einen genauen Schwellenwert für SMN zu geben, oberhalb dessen solche Störungen nicht auftreten. Indem wir die SMN-Menge durch lentivirale *shSmn*-Behandlung auf 20-25 % der Kontrollen reduzierten wurde die zuvor vermutete Übererregbarkeit sofort deutlich, was die Befunde anderer rekapitulierte und uns ein streng phänotypisches System für zukünftige Experimente lieferte. Wir beobachteten keine Veränderung in der spontanen neuronalen Netzwerkaktivität von SMN-defizienten MNs.

Frühere Studien zeigten eine Änderung der Häufigkeit und der Clusterung von Cav2.2-Kanälen und eine daraus resultierende Änderung der intrazellulären Kalziumsignale bei SMA, die durch eine Überexpression von PLS3 verbessert werden konnte. Auf der Grundlage unserer aktuellen Studie, in

der $Ca_v2.2$ als ein mit PLS3 interagierendes Protein identifiziert wurde, könnten zukünftige elektrophysiologische Studien mit PLS3-überexprimierenden SMA-MNs Licht auf eine mögliche (schützende) Rolle von PLS3 in Bezug auf die neuronale Funktion und Erregbarkeit bei SMN-Verlust werfen.

Zusammenfassend tragen unsere Ergebnisse zu einem besseren Verständnis der gestörten Kalziumregulationswege im Verlauf von SMA bei und liefern Hinweise auf eine modulierende Rolle von PLS3 in der intrazellulären Kalziumhomöostase. Weitere Forschungen scheinen unerlässlich, um die zugrunde liegenden molekularen Mechanismen umfassend zu verstehen.