

# Identification and Characterization of Spinal Muscular Atrophy (SMA) Modifiers – Insights from Cellular and Vertebrate Disease Models

## Summary

Autosomal recessive proximal spinal muscular atrophy (SMA) is the leading genetic cause of lethality in childhood and no cure is available yet. SMA is caused by homozygous deletion, gene conversion or rarely mutations of the *SMN1* gene leading to the progressive degeneration of spinal alpha motoneurons. Humans, as the only species, possess in addition to the telomeric *SMN1* gene a centromeric, almost identical *SMN2* copy gene. However, the *SMN2* copy produces only about 10% correctly spliced full-length *SMN2* transcripts and protein due to a single silent nucleotide exchange in exon 7 that disrupts correct splicing. The disease severity mainly depends on the copy number of *SMN2*, which is therefore considered as the main SMA modifier. In rare cases, individuals carry an SMA causing genotype but remain completely asymptomatic throughout their life. Our group aims to identify in these individuals genetic modifiers that are differentially regulated and thus protect them from getting disease symptoms. The identification of genetic modifiers not only allows to unravel novel pathways affected by SMN loss but also to develop potential therapies.

One of these modifiers identified by our group is neurocalcin delta (NCALD). It was found to be downregulated in five asymptomatic individuals carrying homozygous *SMN1* deletion and four *SMN2* copies usually causing a mild SMA phenotype. NCALD downregulation was further confirmed to be beneficial in *in vitro* and animal model studies (nematode, zebrafish, and mouse) as it ameliorated or rescued several SMA pathologies by restoring clathrin-mediated endocytosis. In case of the SMA mouse model, however, the impact of NCALD knockdown on the phenotype was rather subtle most likely due to severe peripheral organ impairments and early death caused by SMN loss. In order to mimic the situation we found in asymptomatic individuals, a milder SMA mouse model was established in this work by breeding SMA mice first on the more robust mixed genetic background (mixed<sub>50</sub>) and second, by subcutaneous injection of a low-dose SMN ASO that increases correct *SMN2* splicing leading to slightly elevated SMN levels. These mice had no peripheral organ impairments and an increased lifespan of over 180 days but showed neuronal and motoric disabilities resembling the mild SMA symptoms in humans. We demonstrated that heterozygous *Ncald* knockout in this mild SMA mouse model improved neuromuscular junction (NMJ) size and maturation, enhanced motoric abilities, and moderately increased nerve conduction capacities. Together, these findings suggest a novel therapy

option for SMA by a combinatorial approach of the SMN ASO with additional NCALD downregulation treatment to fully counteract disease symptoms as in asymptomatic individuals.

NCALD belongs to a conserved protein family of neuronal calcium sensors (NCS). In the second part of this work, the impact on the SMA phenotype of another NCS protein family member, called neuronal calcium sensor 1 (NCS1), was investigated. NCS1 downregulation rescued neurite/axon outgrowth defects caused by SMN loss both on cellular level and in the SMA zebrafish model and thus can be considered as a potential novel SMA modifier. Interestingly, NCS1 downregulation had no or a rather negative impact on fluid-phase and clathrin-mediated endocytosis and therefore likely acts by another pathway than NCALD.

Caveolin-1 (CAV1) was recently identified as an interaction partner of SMN. CAV1 is an important mediator of caveolae-dependent endocytosis and cholesterol homeostasis and together with the findings of impaired endocytosis and lipid homeostasis in SMA led to the investigation of CAV1 in the third part of this work. Initial results confirmed CAV1 expression in motoneurons and that CAV1 is most likely misregulated and mislocalized upon SMN loss. Moreover, preliminary data pointed to a decreased caveolae-dependent endocytosis in SMA and follow-up studies will be performed to investigate further the role of CAV1 in the background of SMA.

## Zusammenfassung

Autosomal rezessive proximale spinale Muskelatrophie (SMA) ist weltweit die häufigste genetische Ursache des Säuglingstodes für die bisher noch keine Heilung verfügbar ist. SMA wird durch homozygote Deletion, Genkonversion oder, in selteneren Fällen, Mutationen des *SMN1*-Gens verursacht, welches zur fortschreitenden Degeneration der spinalen Alpha-Motorneurone führt. Menschen sind die einzige Spezies, die neben dem telomeren *SMN1*-Gen ein zentromeres, fast identisches *SMN2*-Kopiegen besitzen. Die *SMN2*-Kopie produziert jedoch nur etwa 10% korrekt gespleißtes Vollängen-*SMN2* Transkript und Protein was durch einen einzigen stillen Nukleotidaustausch in Exon 7, der das korrekte Spleißen beeinträchtigt, verursacht wird. Die Schwere der Erkrankung hängt hauptsächlich von der Kopienzahl des *SMN2* Gens ab, welches daher als hauptsächliches SMA-Modifizergen betrachtet wird. In seltenen Fällen haben Individuen einen SMA-verursachenden Genotyp, bleiben jedoch während ihres ganzen Lebens völlig asymptomatisch. Unsere Gruppe zielt darauf ab, in diesen Personen modifizierende Gene zu identifizieren, die unterschiedlich reguliert sind und so diese Individuen vor Krankheitserscheinungen schützen. Die Identifizierung von modifizierenden Genen erlaubt es uns nicht nur, neuartige, durch SMN-Verlust beeinträchtigte Signalwege zu entschlüsseln, sondern auch potenzielle Therapien zu entwickeln.

Eines dieser modifizierenden Gene, das von unserer Gruppe identifiziert worden ist, ist Neurocalcin delta (NCALD). Die NCALD Expression war herunterreguliert in fünf asymptomatischen Individuen, die eine homozygote *SMN1*-Deletion und vier *SMN2*-Kopien aufwiesen, was für gewöhnlich eine milde Form der humanen SMA verursachen würde. Der positive Einfluss von NCALD-Herunterregulierung wurde in *in vitro*- und Tiermodell-Studien (Nematoden, Zebrafisch und Maus) weiter bestätigt, da sie mehrere SMA-Pathologien durch Wiederherstellung der Clathrin-vermittelten Endozytose verbessert oder gerettet hat. Im Falle des SMA-Mausmodells war jedoch die Auswirkung der NCALD-Herunterregulierung auf den Phänotyp eher gering wahrscheinlich aufgrund der schweren peripheren Organbeeinträchtigungen und des frühen Todeseintritts, der durch den SMN-Verlust verursacht wurde. Um die Situation wie sie bei asymptomatischen Personen vorliegt nachzubilden, wurde in dieser Arbeit ein milderes SMA-Mausmodell etabliert. Hierzu wurde zunächst ein SMA-Mausmodell auf den robusteren gemischten genetischen Hintergrund (*mixed<sub>50</sub>*) gekreuzt, dem zweitens eine subkutane Injektion eines niedrigdosierten SMN-ASOs verabreicht wurde, welches das *SMN2*-Spleißen korrigiert und dadurch zu erhöhten SMN-Mengen führt. Diese Mäuse hatten keine peripheren Organbeeinträchtigungen und eine erhöhte Lebensdauer von über 180 Tagen; sie wiesen jedoch neuronale und motorische Beeinträchtigungen auf, die dem menschlichen milden SMA-Phänotyp symptomatisch ähnlich waren. Wir haben gezeigt, dass heterozygote *Ncald*-Knockout in diesem milden SMA-Mausmodell die neuromuskuläre Endplattengröße sowie –reifung verbesserte, motorische

Fähigkeiten wiederherstellte und eine mäßig erhöhte Kapazität der Erregungsweiterleitung in den Nerven verursachte. Diese Ergebnisse schlagen eine neuartige Therapieoption für die Behandlung von SMA vor, indem ein kombinatorischer Ansatz bestehend aus dem SMN ASO mit zusätzlicher NCALD-Herunterregulation verabreicht wird, um den Krankheitserscheinungen wie bei den asymptomatischen Individuen vollständig entgegenzuwirken.

NCALD gehört zu der konservierten Proteinfamilie der neuronalen Kalziumsensoren (NCS). Im zweiten Teil dieser Arbeit wurde der Einfluss eines anderen NCS-Proteinfamilienmitglieds auf den SMA-Phänotyp, genannt neuronaler Kalziumsensor 1 (NCS1), untersucht. NCS1-Herunterregulation rettete sowohl auf zellulärer Ebene als auch im SMA-Zebrafischmodell den Neuriten-/Axonen-Auswuchsdefekt der durch SMN-Verlust verursacht wurde. NCS1 kann somit als potentielles SMA-Modifizierendes betrachtet werden. Interessanterweise hatte die NCS1-Herunterregulation keine oder eine eher negative Auswirkung auf die Fluidphasen- und Clathrin-vermittelte Endozytose und spielt daher wahrscheinlich in einem anderen Signalweg als NCALD eine Rolle.

Caveolin-1 (CAV1) wurde vor kurzem als Interaktionspartner von SMN identifiziert. CAV1 ist ein wichtiger Vermittler der Caveolae-abhängigen Endozytose und Cholesterin-Homöostase wohingegen eine beeinträchtigte Endozytose und Lipid-Haushalt in SMA bereits gezeigt wurde. Aufgrund dieses Sachverhalts wurde CAV1 im dritten Teil dieser Arbeit im Hintergrund von SMA untersucht. Vorläufige Ergebnisse bestätigten CAV1-Expression in Motoneuronen und dass CAV1 wahrscheinlich misreguliert sowie mislokalisiert aufgrund von SMN Verlust ist. Darüber hinaus weisen vorläufige Daten auf eine verminderte Caveolae-abhängige Endozytose in SMA hin. Weitere Untersuchungen zur Rolle von CAV1 im Hintergrund von SMA werden zur Zeit noch durchgeführt.