

Novel Modifiers for Inherited Neurodegenerative Disorders

- Spinal Muscular Atrophy and Ataxia –

Neurodegenerative Erkrankungen, einschließlich autosomal rezessive Spinale Muskelatrophie (SMA), Amyotrophe Lateralsklerose, Morbus Parkinson, erbliche spastische Paraplegie und Ataxie, teilen oft gemeinsame Pathomechanismen. Beispiele für solche Pathomechanismen sind Defekte in der Endozytose oder Ca^{2+} Homöostase. Modifizierende Faktoren welche diese gemeinsamen Signalwege beeinflussen, haben ein großes Potential krankheitsübergreifend zu agieren. Plastin 3 (PLS3)-Überexpression, welche die Endozytose beeinflusst, stellt ein solches Beispiel dar. PLS3-Überexpression wurde als genetischer krankheitsmodifizierender Faktor in asymptomatischen Individuen identifiziert, die trotz genetischer Prädisposition für SMA, die Krankheit nicht ausprägten. SMA ist eine schwerwiegende neurodegenerative Erkrankung und die häufigste Ursache für Säuglingssterblichkeit. SMA wird verursacht durch homozygote Deletion oder Mutation des *SMN1* Gens, wobei der Schweregrad der Krankheit hauptsächlich durch die *SMN2*-Kopienzahl bestimmt wird. *SMN2* ist ein nahezu identisches Kopiegen von *SMN1*, es produziert jedoch hauptsächlich inkorrekt gespleißtes *SMN2* Transkript. Vor kurzem wurde die erste Therapie für SMA, Spinraza, genehmigt, die auf der Korrektur des fehlerhaften Spleißens des *SMN2* Gens basiert. Für schwerbetroffene SMA1 Patienten, welche 60% aller SMA Patienten darstellen, ist diese Therapie höchstwahrscheinlich unzureichend. PLS3-Überexpression und Neurocalcin delta (NCALD) Reduktion, zwei *SMN*-unabhängige modifizierende Faktoren, stellen somit ein attraktives therapeutisches Target für einen kombinatorischen Therapieansatz dar. Der exakte Mechanismus ist jedoch noch nicht vollständig aufgeklärt. Um diese Frage zu beantworten und um neue modifizierende Faktoren zu identifizieren, haben wir uns auf PLS3-Interaktionspartner fokussiert. Hierbei konnten wir in vorangegangenen Studien Calcineurin-like EF-hand Protein 1 (CHP1) als einen neuen direkten PLS3-Interaktionspartner identifizieren. Interessanterweise, verursacht der CHP1 Verlust eine autosomal-rezessive zerebelläre Ataxie. Zusammengefasst sind die Ziele dieser Arbeit wie folgt: 1) die Analyse von CHP1 Reduktion als potentieller modifizierender Faktor für SMA, 2) die Identifizierung von gemeinsamen Interaktionspartnern von *SMN* und PLS3, und 3) die Analyse von PLS3 als krankheitsübergreifender modifizierender Faktor hinsichtlich Ataxie, welche durch *Chp1* Mutation verursacht wird.

Im ersten Teil dieser Arbeit zeigen wir, dass die Interaktion zwischen PLS3 und CHP1 Ca^{2+} -unabhängig ist. CHP1 ist ein ubiquitär vorkommendes Protein, welches überwiegend im zentralen Nervensystem angereichert und vor allem an SMA relevanten Stellen lokalisiert ist, einschließlich der neuronalen Wachstumsknospe des Motoneurons (MNs) und der motorischen Endplatten (NMJ). CHP1 wird während der neuronalen Entwicklung dynamisch heraufreguliert. Interessanterweise konnten wir zeigen, dass das CHP1 Level im Rückenmark und Gehirn von SMA Mäusen erhöht ist, jedoch nicht im *transversus abdominis* Muskel. Bemerkenswerterweise stellt CHP1-Reduktion die verminderte Neuritenlänge von NSC34 MN-ähnlichen Zellen mit unzureichenden *SMN*-Protein wieder her. Im Gegensatz wird das Neuritenwachstum durch CHP1-Überexpression inhibiert. Diese Ergebnisse implizieren, dass CHP1 ein negativer Regulator für das Neuritenwachstum ist. Dennoch konnte CHP1-Reduktion, durch genetische Modifizierung mittels der *vacillator* (*vac*) Mutation, den SMA-Phänotyp von schwer betroffenen SMA-Mäusen nicht verbessern. Daher haben wir den Einfluss von CHP1-Reduktion auf einem intermediären SMA-Phänotyp analysiert. Wir konnten zeigen, dass eine subkutane Injektion einer suboptimalen Dosis von *SMN*-ASO in präsymptomatischen neonatalen Mäusen die durchschnittliche Überlebensrate von schwer betroffenen SMA Mäusen verdoppelte,

wohingegen zusätzliche CHP1-Reduktion die durchschnittliche Überlebensrate zusätzlich 1,6-Fach verlängerte. Weiterhin verbesserte die zusätzliche CHP1-Reduktion charakteristische SMA-Krankheitsmerkmale, einschließlich elektrophysiologischer Defekte, reduzierter Länge der Motoraxone, der Anzahl der propriozeptiven Synapsen pro MN Soma, reduzierter NMJ-Größe und fehlerhafter Reifung, und reduzierter Muskelfasergröße. Mechanistisch konnten wir zeigen, dass *Chp1*-Reduktion in NSC34 Zellen die Makropinozytose verdreifacht, wobei die Clathrin-abhängige Endozytose nicht betroffen war. Somit konnte *Chp1*-Reduktion die fehlerhafte Endozytose in *Smn*-defizienten Zellen retten. Weiterhin konnten wir zeigen, dass *Chp1*-Reduktion die Aktivität von Calcineurin signifikant erhöht. Calcineurin ist eine Ca^{2+} -Calmodulin-abhängige Phosphatase, welche endozytotische Protein dephosphoryliert. Die Calcineurin-Aktivität in *Smn*-defizienten Zellen war hingegen reduziert. Übereinstimmenderweise konnten wir sowohl eine Dynamin 1 Hyperphosphorylierung in SMA MN zeigen, als auch eine Normalisierung dessen durch CHP1-Reduktion. Zusammenfassend zeigen wir hier, dass CHP1-Reduktion ein neuer SMA-krankheitsmodifizierender Faktor ist, welcher charakteristische Krankheitsmerkmale verbessert, indem er die Calcineurin-Aktivität erhöht und dadurch die Endozytose und schlussendlich die Neurotransmission verbessert. Somit stellt CHP1-Inhibition ein attraktives therapeutisches Ziel für einen kombinatorischen Ansatz dar.

Im zweiten Teil dieser Arbeit hatten wir im Rahmen einer Kollaboration mit A. Hart (Brown Universität, Boston, USA) die Analyse der funktionellen Verbindung zwischen SMN und PLS3 als Zielsetzung. Aus diesem Grund haben wir nach potentiellen gemeinsamen Interaktionspartnern gesucht. Hierbei konnten wir heterogeneous nuclear ribonuclear protein F (hnRNP F) and H als gemeinsame Interaktionspartner sowohl für SMN als auch für PLS3 mittels Co-Immunopräzipitation und Co-Lokalisierungsanalyse identifizieren und bestätigen. In Bezug darauf konnte das Hart Labor zeigen, dass Herunterregulierung von *sym-2*, dem Orthologon von hnRNP F/H, endozytotische Defekte in einem *C. elegans* SMA-Modell unterdrückt und neuromuskuläre Defekte rettet. Diese Ergebnisse tragen dazu bei, den SMN-PLS3 Komplex besser zu verstehen, und implizieren, dass SMN, PLS3 und hnRNP F/H funktionell den Endozytose-Signalweg gemeinsam haben.

Im letzten Teil dieser Arbeit wurde das Potential von PLS3 als ein krankheitsübergreifender modifizierender Faktor in Bezug auf die autosomal-rezessive zerebelläre Ataxie, welche durch Verlust von CHP1-Protein im *vacillator* Mausmodell verursacht wird, analysiert. Interessanterweise konnten wir beobachten, dass die transgene PLS3-Überexpression die Ausprägung des typischen ataktischen Ganges im frühen Krankheitsstadium verzögert, jedoch nicht rettet. Übereinstimmenderweise konnten wir zeigen, dass obwohl die Axone der Purkinje-Neurone weiterhin fehlten, PLS3-Überexpression die Anzahl der Purkinje-Neurone im Zerebellum von *Chp1^{vac/vac}; PLS3^{tg/tg}* Mäusen im Vergleich zu *Chp1^{vac/vac}* Mäusen erhöhte. Diese Ergebnisse implizieren, dass PLS3-Überexpression den Purkinje-Zelltod in *vacillator* Mäusen verzögert und dadurch die motorische Leistung im frühen Krankheitsstadium verbessert. Erste Ergebnisse zeigen, dass PLS3-Überexpression sehr wahrscheinlich die vormals beschriebene inkorrekte Membranlokalisierung von NHE1 im *vacillator* Mausmodell verbessert, was wiederum zu einer Verbesserung der pH-Homöostase führt, welche schlussendlich den Purkinje-Zelltod verzögert. Weitere Analysen sind jedoch unabdingbar, um den grundlegenden Mechanismus vollends zu verstehen.