

Inês do Carmo Gil Gonçalves - **MicroRNAs in Spinal Muscular Atrophy: Mechanisms Underlying MicroRNA Dysregulation in Motor Neuron Diseases**

Tag der mündlichen Prüfung: 15.1.2018

SUMMARY

MicroRNAs (miRNAs) are conserved endogenous small non-coding RNAs that direct post-transcriptional silencing of mRNA targets via complementary sequences. Acting in a time- and tissue-specific manner, aberrant miRNA expression in neuronal cells has been increasingly correlated with pathogenesis of neurodegenerative diseases, including Spinal Muscular Atrophy (SMA) and Amyotrophic Lateral Sclerosis (ALS). SMA is a devastating autosomal-recessive inherited pediatric neurodegenerative disease caused by homozygous deletion, gene conversion or mutations in the Survival of motor neuron 1 gene (SMN1), thus leading to deficiency of the ubiquitously expressed survival of motor neuron protein (SMN). The clinical hallmarks of SMA include progressive degeneration and loss of spinal motor neurons, and subsequent skeletal muscle weakness and atrophy.

In our recent work, we provided sustaining evidence of direct consequence of miRNA dysfunction in SMA axons by demonstrating that increased miR-183 expression targets the 3'-UTR of mTOR to inhibit axonal local translation, thus suppressing axonal growth. While accumulated data have strongly disclosed profound alterations of miRNA expression in SMA, the molecular mechanisms underpinning miRNA dysregulation in SMA neurodegeneration are still incompletely understood. With this in mind, the utmost goal of this Ph.D. dissertation was to uncover underlying mechanisms for changes in miRNA expression in SMA. Given that miRNAs are the final product of complex stepwise biogenesis and decay pathways under tight regulation, we hypothesized that SMN loss might interfere with those pathways. By profiling motor neuron-specific expression of major genes involved in miRNA-processing pathways, we found a reduction of DROSHA levels, a protein essential for the first step of miRNA biogenesis. We showed that this reduction translates into impaired microprocessor complex functionality and subsequent aberrant miRNA expression in motor neurons. However, a new question raised: How is DROSHA protein reduced in SMA motor neurons? Given the broad importance of DROSHA at cellular level, mechanisms regulating its expression including splicing, post-translational

modification, and degradation by the proteasome have been intensively studied. Inhibition of those pathways excluded their role in DROSHA downregulation in motor neurons; instead, our study unveiled a new post-translational mechanism governing DROSHA expression in motor neurons: Autophagy. Remarkably, stimulating neuronal activity in control neurons leads to a reduction of DROSHA while autophagy was enhanced, providing strong evidence that neuronal activity induces autophagy to reduce DROSHA in SMA motor neurons. The conjecture of this results raised another important question: why does autophagy degrade DROSHA in SMA? Surprisingly, when using a lentivirus-based system to knockdown Drosha we found that its reduction enhanced axonal growth. As impaired axonal growth is one of the most characterized hallmarks of SMA motor neurons, the results presented in this study unveiled that autophagy regulates RNA metabolism and neuronal growth via the DROSHA/miRNA pathway as a compensatory mechanism in SMA. Furthermore, this results strongly suggest a cell-type specific reduction of DROSHA by autophagy to improve motor neuron impairment.

We extend our investigation further and characterized the expression levels of ribonucleases engaged in the regulation of the steady expression levels of mature miRNA; more precisely, two 5'-3' exoribonucleases: Xrn1 and Xrn2. We could not confirm misregulation of these nucleases in SMA motor neurons. However, growing evidence has shown that XRN1 is increasingly expressed in the brain, most preeminently in hippocampal neurons. We hypothesized that dysregulated miRNA expression might be caused by impaired turnover at the neurites of hippocampal neurons. Indeed, immunofluorescence assay revealed a markedly reduced expression of these miRNA-processing nucleases in the axons of SMA neurons. While these results strongly point decreasing Xrn1 and Xrn2 as a presumably cause of miRNA dysregulation in SMA, also imply that aberrant miRNA decay might be highly cell-type specific.

Moreover, in the scope of a collaborative work performed in *C. elegans*, we report that SMN loss impairs the expression of miR-128 and its mRNA target in SMA motor neurons. In concomitance with the *C. elegans* findings, we confirmed downregulation of miR-128 and the consequent increase of its downstream target, the Muscarinic Acetylcholine Receptor M2 (Chrm2). We hypothesized that increased expression of CHRM2 may contribute to motor neuron defects reminiscent of SMN deficiency. Indeed, inhibition of CHMR2 in SMA motor neurons reverted those defects by rescuing motor neuron axonal growth. Therefore, we established a novel functional and mechanistic link between SMA and miRNA pathway.

The findings presented in the current study uncover cell-specific pathways underlying miRNA dysregulation in SMA pathology, while reinforces the importance of miRNA function in neurodegenerative disorders.

ZUSAMMENFASSUNG

MicroRNAs (miRNAs) sind konservierte, körpereigene, kleine nicht kodierende RNAs, welche die posttranskriptionelle Stilllegung von mRNA Zielen mit Hilfe von komplementären Sequenzen dirigiert. In einer Zeit und Gewebe- Spezifität fungierend wurde eine ungewöhnliche miRNA Expression in Nervenzellen vermehrt mit der Pathologie neurodegenerativer Erkrankungen, wie Spinaler Muskelatrophie (SMA) und Amyotropher Lateralsklerose (ALS) assoziiert. SMA ist eine verheerende autosomal rezessive, erbliche, pädiatrische neurodegenerative Erkrankung, welche durch die homozygote Deletion, Genkonvertierung oder Mutation des Survival of motor neuron 1 gene (SMN) und somit einem Defekt des ubiquitär exprimierten survival of motor neuron protein (SMN) hervorgerufen wird. Die klinischen Kennzeichen der SMA beinhalten die fortschreitende Degeneration und den Verlust von spinalen Motoneuronen und anschließender Muskelschwäche und Atrophie.

In unserer derzeitigen Arbeit liefern wir den nachhaltigen Beweis der direkten Folgen von miRNA Funktionsstörungen in SMA Axonen, dadurch dass eine gesteigerte miR-183 Expression auf die 3'-UTR des mTOR abzieht um axonale, lokale Translation zu hemmen und somit das axonale Wachstum zu unterdrücken. Auch wenn zunehmend Ergebnisse Veränderungen der miRNA Expression in SMA gezeigt haben, ist der molekulare Mechanismus der miRNA Fehlregulierung in SMA Neurodegeneration nicht vollständig verstanden.

Unter diesem Aspekt ist das höchste Ziel dieser Doktorarbeit die Darlegung der zugrundeliegenden Mechanismen, die zu Veränderungen der miRNA Expression in SMA führen. Dadurch, dass miRNAs das Endprodukt einer komplexen schrittweisen Biogenese sind und Signalwegen enger Regulation unterliegen, vermuten wir, dass der Verlust von SMN möglicherweise in diese Signalwege eingreift. Durch Profilierung Motoneuron-spezifischer Expressionen von Genen, welche in miRNA-prozessierenden Signalwegen relevant sind, fanden wir eine Reduktion des DROSHA Levels, einem Protein das essentiell für die miRNA Biogenese notwendig ist. Wir haben gezeigt, dass diese Reduktion zu einer Beeinträchtigung der Mikroprozessor Komplex Funktionalität und in Folge dessen zu einer geänderten miRNA Expression in Motoneuronen führt. Daraus ergab sich eine neue Fragestellung: Wie ist das DROSHA Protein in SMA Motoneuronen verringert? Durch die breite Bedeutung von DROSHA auf zellulärer Ebene wurden die Mechanismen der Genregulation, sowie das Spleißen, posttranslationale Modifikationen und der Abbau durch das Proteasom intensiv erforscht. Die Hemmung dieser Signalwege schloss ihre Rolle in der DROSHA Herabregulierung in Motoneuronen aus; stattdessen zeigen unsere

Untersuchungen einen neuen posttranslationalen Mechanismus, der die Expression von DROSHA in Motoneuronen regelt: Die Autophagie. Bemerkenswerterweise führte die Stimulation der neuronalen Aktivität in Kontrollneuronen zu einer Reduktion von DROSHA, während Autophagie stark gesteigert wurde, was einen starken Beweis dafür liefert, dass neuronale Aktivität Autophagie induziert, um DROSHA in SMA-Motoneuronen zu reduzieren. Die Vermutung dieser Ergebnisse warf eine weitere wichtige Frage auf: Warum baut Autophagie DROSHA in SMA ab? Überraschenderweise fanden wir unter Verwendung eines Lentivirus-basierten Systems zum knockdown von DROSHA, dass dessen Reduktion das axonale Wachstum verstärkt. Da ein gestörtes axonales Wachstum eines der meist charakterisierten Kennzeichen von SMA Motoneuronen ist, zeigen die Ergebnisse dieser Studie, dass Autophagie den RNA Metabolismus und das neuronale Wachstum über den DROSHA/ miRNA Signalweg als kompensatorischen Mechanismus in SMA reguliert. Darüber hinaus deuten diese Ergebnisse stark auf eine zelltypspezifische Reduktion von DROSHA durch die Autophagie hin, um die Motoneuron Beeinträchtigung zu verbessern. Wir erweiterten unsere Untersuchungen weiter und charakterisierten das Expressionsniveau von Ribonukleasen, die an der Regulation des konstanten Expressionslevels reifer miRNAs beteiligt sind; genauer gesagt, zwei 5'-3' Exoribonukleasen: Xrn1 und Xrn2. Wir konnten eine Fehlregulation dieser Nukleasen in SMA Motoneuronen nicht bestätigen. Allerdings zeigten zunehmend Hinweise, dass XRN1 vermehrt im Gehirn und am stärksten in Nervenzellen des Hippocampus exprimiert wird. Wir vermuten, dass die fehlregulierte miRNA Expression durch einen gestörten Umsatz an den Neuriten von Nervenzellen des Hippocampus verursacht wird. In der Tat zeigt der Immunfluoreszenztest eine deutlich reduzierte Expression dieser miRNA-prozessierenden Nukleasen in den Axonen von SMA Nervenzellen. Während diese Ergebnisse eine starke Abnahme von XRN1 und XRN2 als eine mögliche Ursache für eine miRNA-Fehlregulation in SMA zeigen, implizieren sie auch, dass ein ungewöhnlicher miRNA-Zerfall sehr zelltypspezifisch sein könnte.

Darüber hinaus berichten wir, im Rahmen einer Kooperationsarbeit an *C. elegans*, dass der Verlust von SMN die Expression von miR-128 und seinem mRNA Ziel in SMA Motoneuronen beeinträchtigt. Zusammen mit den Erkenntnissen aus *C. elegans* bestätigten wir die Herabregulierung von miR-128 und die daraus folgende Erhöhung seines nachgestellten Ziels, dem Muscarin-Acetylcholin-Rezeptor M2 (Chrm2). Wir vermuten, dass eine erhöhte Expression von CHRM2 zu Motoneuronendefekten beitragen kann, die an einen SMN-Mangel erinnern. Tatsächlich hat die Hemmung von CHRM2 in SMA-Motoneuronen das axonale Wachstum der Motoneuronen wiederhergestellt. Folglich etablierten wir eine neue funktionelle und mechanistische Verbindung zwischen SMA und dem miRNA-Signalweg.

Die in der vorliegenden Studie vorgestellten Ergebnisse enthüllen zellspezifische Signalwege, die der miRNA-Fehlregulation in der SMA-Pathologie zugrunde liegen. Wir unterstreichen die Bedeutung der miRNA-Funktion in neurodegenerativen Erkrankungen.