

## Poster P.04.28

### IDENTIFICATION OF NEW DRUGGABLE TARGETS AND POTENTIAL THERAPEUTIC COMPOUNDS FOR SPINAL MUSCULAR ATROPHY, USING A C.ELEGANS MODEL OF NEURODEGENERATION

Santonicola P., Cieri F., La Rocca F., Gallotta I., Zampi G., Di Schiavi E.\*

*IBBR ~ NAPOLI ~ Italy*

Spinal muscular atrophy (SMA) is a neuromuscular disorder characterized by the selective degeneration of lower spinal cord motor neurons (MNs), which leads to progressive muscle atrophy and death. SMA is caused by mutations of the Survival of Motor Neuron gene, *Smn1*, and although the genetic bases have been extensively studied, the molecular mechanisms underlying MNs death are still elusive. Two treatments have been recently approved: Nusinersen, that can redirect pre-mRNA splicing of a SMN1 paralog, and Zolgensma, a gene therapy. However, both therapies have a very narrow therapeutic window, the complete rescue of the pathological phenotype is achieved only when the treatment is administered during the pre-symptomatic phase and the data are relatively sparse on drug efficacy for types III and IV SMA. Therefore, a comprehensive whole-lifespan therapeutic approach that comprises symptomatic cases and all clinical phenotypes is needed, involving also SMN-independent strategies. In the absence of a specific molecular target, chemical and genetic screens can be performed using small model systems that can, at the same time, elucidate the molecular basis of the disease and identify potential therapeutic compounds. *C. elegans* represents one of these valuable model organisms for human diseases, since its genome encodes many human disease orthologs and the biological processes are well conserved. Importantly, the use of *C.elegans* allows to strongly reduce the number of vertebrate animals used, in compliance with Italian and international guidelines, fulfilling the 3Rs principles (Replacing the use of mammals; Reducing the number of mammals used to a minimum; Refining the way experiments are carried out). We developed an innovative genetic model, which enabled us to efficiently reduce the function of *smn-1* gene, the *C.elegans* homolog of *Smn1*, specifically in MNs. Our results provide strong evidence that this is a powerful and unique tool to study SMA, that allows both the study of the neurodegeneration process in vivo and the test of new therapeutics (Gallotta et al., 2016). Using this model we discovered that WDR79/TCAB-1 and SYNCRIP/HRP-2, genetically interacts in vivo with *Smn1*, in different model species (Di Giorgio et al., 2017; Rizzo et al., 2019). Moreover we successfully used this model for unbiased genetic and drug screenings, so that we identified twenty suppressor mutants and a natural extract being able to rescue the neurodegeneration in worms (De Carlos Cáceres et al., 2018; Mazzarella et al., 2019). We are now using genetic manipulations, drug treatments and phenotypic analysis to identify the genetic loci affected in the twenty suppressor mutants retrieved from the screening and the molecule in the natural extract capable of rescuing SMN function. Data gathered will be translated in the third year of the project into a mammalian model to refine future strategies for restoring MNs functionality in patients.

L'atrofia muscolare spinale (SMA) è una malattia caratterizzata dalla degenerazione selettiva dei motoneuroni del midollo spinale, che porta alla progressiva atrofia muscolare e morte dei pazienti. La SMA è causata da mutazioni nel gene *Smn1* e sebbene le basi genetiche siano state ampiamente studiate, i meccanismi molecolari che causano la morte dei motoneuroni sono ancora ignoti. Due trattamenti SMN-dipendenti sono stati recentemente approvati: Nusinersen e Zolgensma. Tuttavia, entrambe le terapie hanno una finestra terapeutica molto ristretta, il completo recupero del fenotipo patologico si ottiene solo quando il trattamento viene somministrato durante la fase pre-sintomatica e i

dati sono relativamente scarsi sull'efficacia per i pazienti con SMA III e IV. Pertanto, è necessario un approccio terapeutico globale che comprenda anche i casi sintomatici e tutti i fenotipi clinici, anche utilizzando strategie SMN-indipendenti. In assenza di un target molecolare specifico, è possibile eseguire screening chimici e genetici utilizzando piccoli sistemi modello, che possono, allo stesso tempo, chiarire le basi molecolari della malattia e permettere l'identificazione di potenziali composti terapeutici. *C. elegans* rappresenta uno di questi organismi modello utili allo studio delle malattie umane, poiché il suo genoma codifica per molti geni simili a quelli responsabili di malattie umane ed i processi biologici sono ben conservati. Inoltre l'uso di *C. elegans* consente di ridurre fortemente il numero di mammiferi utilizzati, in conformità con le linee guida italiane e internazionali, soddisfacendo i principi delle 3R (sostituzione dell'uso dei mammiferi; riduzione al minimo del numero di mammiferi utilizzati; perfezionamento del modo in cui vengono eseguiti gli esperimenti). A tal fine abbiamo sviluppato un modello genetico che ci ha permesso di ridurre efficacemente la funzione del gene *smn-1*, omologo in *C. elegans* di *Smn1*. I nostri risultati suggeriscono che il nostro modello è uno strumento potente e unico per studiare la SMA, che consente lo studio del processo di neurodegenerazione in vivo (Gallotta et al., 2016). Usando questo modello abbiamo scoperto che WDR79 e SYNCRIP interagiscono geneticamente in vivo con *Smn1*, in diverse specie modello (Di Giorgio et al., 2017; Rizzo et al., 2019). Inoltre abbiamo usato con successo questo modello per uno screening genetico ed uno farmacologico, che ci hanno permesso di identificare venti mutanti e un estratto naturale in grado di ridurre la neurodegenerazione (De Carlos Cáceres et al., 2018; Mazzarella et al., 2019). Ora stiamo usando analisi genetiche, trattamenti farmacologici e osservazioni fenotipiche per identificare i venti loci genetici e la molecola contenuta nell'estratto naturale, che modificano la funzione di SMN. I dati raccolti saranno tradotti nel terzo anno del progetto in un modello di mammifero per definire nuove strategie volte a ripristinare la funzionalità dei neuroni nei pazienti con SMA.

-De Carlos Cáceres, I., Porto, D. A., Gallotta, I., Santonicola, P., Rodríguez-Cordero, J., Di Schiavi, E., et al. (2018). Automated screening of: *C. Elegans* neurodegeneration mutants enabled by microfluidics and image analysis algorithms. *Integr Biol (United Kingdom)*. doi:10.1039/c8ib00091c.

-Di Giorgio, M. L., Esposito, A., Maccallini, P., Micheli, E., Bavasso, F., Gallotta, I., et al. (2017). WDR79/TCAB1 plays a conserved role in the control of locomotion and ameliorates phenotypic defects in SMA models. *Neurobiol Dis* 105. doi:10.1016/j.nbd.2017.05.005.

-Gallotta, I., Mazzarella, N., Donato, A., Esposito, A., Chaplin, J. C., Castro, S., et al. (2016). Neuron-specific knock-down of SMN1 causes neuron degeneration and death through an apoptotic mechanism. *Hum Mol Genet* 25, 2564–2577. doi:10.1093/hmg/ddw119.

-Mazzarella, N., Giangrieco, I., Visone, S., Santonicola, P., Achenbach, J., Zampi, G., et al. (2019). Green kiwifruit extracts protect motor neurons from death in a spinal muscular atrophy model in *Caenorhabditis elegans*. *Food Sci Nutr*. doi:10.1002/fsn3.1078.

-Rizzo, F., Nizzardo, M., Vashisht, S., Molteni, E., Melzi, V., Taiana, M., et al. (2019). Key role of SMN/SYNCRIP and RNA-Motif 7 in spinal muscular atrophy: RNA-Seq and motif analysis of human motor neurons. *Brain*. doi:10.1093/brain/awy330.

Atrofia Muscolare Spinale

Coordinator: Elia Di Schiavi

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2017

**Telethon Project (nr):**

GGP16203

**Disease Name:**

Spinal Muscular Atrophy

**Keywords:**

Neurodegeneration, C.elegans, Genetic and drug screenings