

Poster P.01.10

SMALL MOLECULES TO RESCUE FOLDING-DEFECTIVE SARCOGLYCANS: IN VIVO ASSESSMENT OF NOVEL THERAPEUTIC STRATEGIES

Sandona" D.*^[1], Scano M.^[1], Fecchio C.^[1], Carotti M.^[1], Soardi M.^[1], Risato G.^[1], Sacchetto R.^[2]

^[1]Dep. of Biomedical Sciences (University of Padova) ~ Padova ~ Italy, ^[2]Dept. Comparative Biomedicine and Food Science (University of Padova) ~ Legnaro (Padova) ~ Italy

Sarcoglycanopathies are rare genetic diseases in which the disruption of the sarcoglycan complex results in sarcolemma fragility and progressive muscle degeneration. Most of the reported cases are due to missense mutations originating a folding-defective sarcoglycan (SG) eliminated by the cells' quality control system, although potentially functional [1-4]. To recover the mutants and avoid complex disruption, we exploited the use of protein folding correctors belonging to the CFTR modulators family [5]. The effective rescue of different SG-mutants has been proved for a few of such molecules by using cell models and, importantly, myogenic cells from sarcoglycanopathy patients [6]. We also tested the combined administration of CFTR correctors, highlighting the additive or even synergic activity of such compounds.

To validate the pharmacological strategy in vivo we have been forced to generate novel animal models of sarcoglycanopathy expressing a folding-defective SG, overcoming the unsuitability of the mouse models available [7-9]. A conventional KI mouse was generated by the introduction of a pathogenic missense mutation in a highly conserved region of the mouse sgcb gene. Unfortunately, despite the mutation in β -SG, the SG-complex assembles and localizes at the sarcolemma and these mice show no sign of myopathy [10]. We postulate that the different outcome of sarcoglycan missense mutations in human and mouse is related to a more permissive mouse quality control system allowing part of the mutant to skip degradation. Thus, to obtain a reliable mouse model of the disease could be mandatory to control mutant expression, rigorously.

As a second strategy, we generated mice with transiently "humanized hinds". Indeed, the adeno associated viral transduction of the hinds of sgca-null mouse pups resulted in hinds expressing the endogenous β -, γ -, δ -SG, and the human α -SG (wild type or mutated) carried by the virus. By this way, we met the need of generating more than one model of the disease, and we had the possibility to control the amount of the mutated α -SG expressed by the virus. No major effects on survival, body weight and general behavior have been observed in transduced animals. Histological and molecular characterization of the hind muscles from 2 months old mice evidenced the recovery of the dystrophic phenotype when the wild type sequence of the human α -SG was transduced, while the presence of a mutated α -SG resulted in pathologic features. Mice with "humanized hinds" were then chronically treated with the most promising CFTR corrector, by intra peritoneal injection. The molecular and histological analyses of the first samples reveal an increase of the α -SG content, a reduction of the signs of myopathy and the re-localization of the SG-complex at the sarcolemma in comparison to the vehicle treated animals. Even though a great variability is present, this is the first in vivo evidence of the CFTR correctors efficacy in sarcoglycanopathy

Piccole molecole per il recupero di sarcoglicani con difetti di ripiegamento: verifica in vivo di nuove strategie terapeutiche

Le sarcoglicanopatie sono malattie genetiche rare che, alterando il complesso dei sarcoglicani (SG), causano una progressiva degenerazione muscolare. Molti dei casi sono dovuti a mutazioni missenso

che generano un SG con difetti di folding che viene eliminato, anche se potenzialmente funzionante, dal sistema di controllo qualità della cellula. Per recuperare i mutanti, evitando la distruzione del complesso, abbiamo usato correttori del folding delle proteine, detti correttori del CFTR, sviluppati per la fibrosi cistica. Alcune di queste molecole permettono di recuperare con successo i mutanti dei SG espressi in modelli cellulari, ma soprattutto nelle cellule muscolari isolate dai pazienti con sarcoglicanopatia. Per proseguire lo sviluppo di questi composti, abbiamo dovuto generare dei nuovi modelli animali della malattia a causa della inadeguatezza di quelli attualmente disponibili. A questo scopo abbiamo prodotto un topo KI introducendo nella sequenza del gene murino una delle mutazioni umane più gravi del β -SG. Purtroppo, pur in presenza di un SG difettivo, il complesso si forma e localizza correttamente e gli animali non manifestano alcun segno di miopatia. Noi pensiamo che questo sia dovuto ad una minor accuratezza del sistema di controllo qualità del topo che permette ad una quota del SG mutato di sfuggire alla degradazione. E' dunque probabile che per generare un modello affidabile sia necessario controllare in modo stringente l'espressione della proteina di interesse.

Come seconda strategia, abbiamo pensato di "umanizzare" le zampe posteriori del topo mediante l'iniezione di un virus (AAD) portante la sequenza dell' α -SG umano (wild type o mutato). In questo modo abbiamo soddisfatto l'esigenza di creare più di un modello di sarcoglicanopatia, considerando le numerose mutazioni missenso responsabili della malattia, e abbiamo la possibilità di controllare l'espressione del SG mutato portato dal virus. L'uso del virus non ha avuto conseguenze su sopravvivenza, crescita e comportamento degli animali. A 2 mesi dall'iniezione del virus, la caratterizzazione istologica e molecolare dei muscoli delle "zampe umanizzate" ha evidenziato il recupero del fenotipo distrofico quando la sequenza usata era quella wild type e la presenza di caratteristiche miopatiche quando la sequenza dell' α -SG era mutata. Topi con le "zampe umanizzate" sono stati quindi trattati cronicamente con il correttore del CFTR più promettente, mediante iniezione intraperitoneale. Le analisi molecolari e istologiche dei primi campioni muscolari rivelano, rispetto ai trattati con il veicolo, un aumento della quantità di α -SG, un recupero dei segni patologici e la localizzazione del complesso al sarcolemma. Nonostante l'alta variabilità dei risultati, questa è la prima evidenza in vivo dell'efficacia dei correttori del CFTR nelle sarcoglicanopatie.

[1] Gastaldello S., D'Angelo S., Franzoso S., Fanin M., Angelini C., Betto R. and Sandonà D.: Inhibition of Proteasome Activity Promotes the Correct Localization of Disease-Causing α -Sarcoglycan Mutants in HEK-293 Cells Constitutively Expressing β -, γ -, and δ -Sarcoglycan. *The American Journal of Pathology* 173: 170–181, 2008.

[2] Sandonà D. and Betto R.: Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert Reviews in Molecular Medicine* 11, 2009.

[3] Bianchini E., Fanin M., Mamchaoui K., Betto R. and Sandonà D.: Unveiling the degradative route of the V247M α -sarcoglycan mutant responsible for LGMD-2D. *Human Molecular Genetics* 23: 3746–3758, 2014.

[4] Carotti M., Fecchio C. and Sandonà D.: Emerging therapeutic strategies for sarcoglycanopathy. *Expert Opinion on Orphan Drugs* 5: 381–396, 2017.

[5] Bell S.C., De Boeck K. and Amaral M.D.: New pharmacological approaches for cystic fibrosis: Promises, progress, pitfalls. *Pharmacology & Therapeutics* 145: 19–34, 2015.

[6] Carotti M., Marsolier J., Soardi M., Bianchini E., Gomiero C., Fecchio C., Henriques S.F., Betto R., Sacchetto R., Richard I. and Sandonà D.: Repairing folding-defective α -sarcoglycan mutants by CFTR correctors, a potential therapy for limb-girdle muscular dystrophy 2D. *Human Molecular Genetics* 27: 969–984, 2018.

[7] Duclos F., Straub V., Moore S.A., Venzke D.P., Hrstka R.F., Crosbie R.H., Durbeej M., Lebakken C.S. and Ettinger A.J.: Progressive Muscular Dystrophy in α -Sarcoglycan-deficient Mice. *The Journal*

of Cell Biology 142: 11, 1998.

[8] Bartoli M., Gicquel E., Barrault L., Soheili T., Malissen M., Malissen B., Vincent-Lacaze N., Perez N., Udd B., Danos O. and Richard I.: Mannosidase I inhibition rescues the human α -sarcoglycan R77C recurrent mutation. Human Molecular Genetics 17: 1214–1221, 2008.

[9] Kobuke K., Piccolo F., Garringer K.W., Moore S.A., Sweezer E., Yang B. and Campbell K.P.: A common disease-associated missense mutation in alpha-sarcoglycan fails to cause muscular dystrophy in mice. Human Molecular Genetics 17: 1201–1213, 2008.

[10] Henriques S.F., Patissier C., Bourg N., Fecchio C., Sandonà D., Marsolier J. and Richard I.: Different outcome of sarcoglycan missense mutation between human and mouse. PLOS ONE 13: e0191274, 2018.

Sarcoglycanopathie

Coordinator: Dorianna Sandona'

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2015

Telethon Project (nr):

GGP15140

Disease Name:

Sarcoglycanopathies (LGMD2D-F)

Keywords:

folding defective protein, CFTR corrector, disease animal model