

Poster P.01.6

EXTRACELLULAR ATP AND T REGULATORY CELLS: NEW THERAPEUTICS TARGETS IN ALPHA-SARCOGLYCAN DEFICIENT MUSCULAR DYSTROPHY (LGMD2D)

Baratto S.^[1], Principi E.^[1], Del Zotto G.^[2], Antonini F.^[2], Panicucci C.^[1], Ognio E.^[3], Bruzzone S.^[4], Benzi A.^[4], Gazzero E.^[5], Minetti C.^[6], Raffaghello L.^[1], Bruno C.^[1]

^[1]Center of Translational and Experimental Myology, Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[2]Department of Research and Diagnostics, Istituto G. Gaslini ~ Genova ~ Italy, ^[3]Animal Facility, IRCS Ospedale Policlinico San Martino ~ Genova ~ Italy, ^[4]Department of Experimental Medicine, Section of Biochemistry, University of Genoa ~ Genova ~ Italy, ^[5]Charité Universität-Experimental and Clinical Research Center ~ Berlin ~ Germany, ^[6]Pediatric Neurology and Muscle Disease Unit, Istituto Giannina Gaslini ~ Genova ~ Italy

Limb girdle muscular dystrophy (LGMD2D), an inherited disorder resulting from mutations in the α -sarcoglycan gene, is further aggravated by chronic inflammation that is finely modulated by extracellular ATP (eATP)/purinoreceptors axis. In particular, the blockade of the eATP/P2X purinergic signalling by a non selective purinoreceptor antagonist delays the dystrophic disease progression and dampens the local inflammatory response in Sgca null mice.

Aims of this study is to evaluate the therapeutic effectiveness of P2X7 pharmacological inhibition in Sgca mice and to characterize the role of eATP/P2 purinergic receptors on human SGC myoblasts.

Treatment of Sgca mice with P2X7 selective antagonist A438079 (A43), administered by intraperitoneal injection every two days at 3 mg/Kg for 12 weeks, significantly improves muscular function evaluated by the Four Limb Hanging test. Serum CK concentrations, a marker of muscle cell degeneration, are slightly decreased in A43-Sgca vs untreated mice. Immunophenotypical analysis by flow cytometry indicates that myeloid infiltrates from limb muscles are significantly reduced in A43-Sgca vs untreated mice. We observe a marked decrease of CD45+/CD11b+/Ly6G+ neutrophils, CD45+/CD11b+/Ly6G-/Ly6C+ activating monocytes, and CD45+/F4/80+ macrophages in A43-Sgca vs untreated animals. In contrast, no quantitative differences in lymphoid infiltrates are observed with the only two exception of CD45+/CD3+/CD1d+ NKT cells which are significantly decreased and CD45+/CD4+/CD25+/Foxp3+ regulatory T cells which are slightly increased in A43-Sgca mice. No quantitative differences in lymphoid and myeloid cell populations are observed in the spleen and peripheral blood of A43-Sgca in comparison to the untreated mice.

To further investigate the eATP/purinoreceptor axis in human samples, we evaluated ATP release and ecto-ATPase activity in myoblasts derived from patients affected by LGMD2D, compared to negative control myoblasts. Our data indicate that ATP release upon cell stimulation with TNF α or with a mechanical stress, is remarkably higher from LGMD2D myoblasts than from control cells. In agreement with the results obtained in Sgca mice, myoblasts from LGMD2D patients exhibit a decreased ecto-ATPase enzymatic activity compared to negative controls. Moreover, eATP, at concentrations in the low micromolar range, has been shown to increase intracellular Ca²⁺ concentration by both P2X and P2Y receptors in myoblasts and myotubes from LGMD2D patients, and not in control cells.

In conclusion, our results indicate that human LGMD2D myoblasts/myotubes are more sensitive to the presence of eATP which is higher in the dystrophic muscular microenvironment and might be responsible of the increased inflammatory infiltrate. In this connection, specific P2X7 pharmacological inhibition might provide a therapeutic approach to slow the disease progression by modulating the innate immune responses.

Il ruolo dell'ATP e dei recettori purinergici nella distrofia muscolare dei cingoli da deficit di alfa-sarcoglicano (LGMD2D): nuove prospettive terapeutiche

La distrofia muscolare dei cingoli da deficit di alfa-sarcoglicano (LGMD2D), patologia ereditaria causata da mutazioni del gene sarcoglicano, è ulteriormente aggravata dalla presenza di infiammazione cronica finemente modulata da molecole altamente dannose quali l'ATP.

L'ATP viene rilasciato dalle fibrocellule muscolari distrofiche esercitando un'azione tossica a seguito dell'interazione con i recettori purinergici, tra cui il P2X7.

Un nostro recente studio condotto su topi con deficit di alfa-sarcoglicano (Sgca) ha dimostrato che il blocco farmacologico dell'asse ATP/recettori purinergici causa una riduzione dei processi infiammatori ed un rallentamento della progressione della malattia.

Lo scopo di questo progetto è quello di i) valutare l'efficacia terapeutica dell'inibizione farmacologica del recettore P2X7 in topi Sgca e ii) caratterizzare il ruolo dell'ATP rilasciato extracellularmente e dei recettori purinergici in mioblasti isolati da pazienti con LGMD2D.

A tal fine è stato utilizzato un farmaco, denominato A438079 (A43), che blocca in modo selettivo il recettore P2X7. Topi Sgca trattati con A43 presentano un miglioramento della funzione muscolare ed una riduzione del CK sierico, noto marcatore di degenerazione muscolare. Inoltre, è stato osservato che a livello dei muscoli degli arti inferiori, questa molecola riduce significativamente la percentuale di diverse cellule infiammatorie tra cui neutrofili, monociti attivati e macrofagi. Al contrario, in altri tessuti, quali la milza ed il sangue periferico, non si osservano differenze quantitative nelle varie popolazioni cellulari infiammatorie.

Parallelamente, abbiamo caratterizzato gli effetti mediati dall'ATP extracellulare e dei recettori purinergici in mioblasti umani isolati da pazienti affetti da LGMD2D.

Nei mioblasti di pazienti LGMD2D il rilascio di ATP è risultato significativamente maggiore rispetto a quelli di controllo, così come l'aumento del calcio intracellulare.

In conclusione, i nostri risultati indicano che le cellule muscolari di pazienti affetti da LGMD2D sono più sensibili alla presenza di ATP che, a sua volta, è più alta nel microambiente muscolare distrofico e, come tale, potrebbe essere responsabile dell'aumento dell'infiltrato infiammatorio. A questo proposito, la specifica inibizione farmacologica del recettore P2X7 potrebbe rappresentare un promettente approccio terapeutico per rallentare la progressione delle sarcoglicanopatie modulando la risposta infiammatoria.

-Sandonà D, Betto R. Sarcoglycanopathies: molecular pathogenesis and therapeutic prospects. *Expert. Rev. Mol. Med.*, 2009; 11:e28.

-Khakh BS, North RA: P2X receptors as cell-surface ATP sensors in health and disease. *Nature* 2006, 442:527-532.

-Gazzerro E, Baldassari S, Assereto S, Fruscione F, Pistorio A, Panicucci C, Volpi S, Perruzza L, Fiorillo C, Minetti C, Traggiai E, Grassi F, Bruno C: Enhancement of Muscle T Regulatory Cells and Improvement of Muscular Dystrophic Process in mdx Mice by Blockade of Extracellular ATP/P2X Axis. *Am J Pathol* 2015, 185:3349-3360.

-Gazzerro E, Baratto S, Assereto S, Baldassari S, Panicucci C, Raffaghello L, Scudieri P, De Battista D, Fiorillo C, Volpi S, Chaabane L, Malnati M, Messina G, Bruzzone S, Traggiai E, Grassi F, Minetti C, Bruno C. (2018) The Danger Signal Extracellular ATP Is Involved in the Immunomediated Damage of α -Sarcoglycan-Deficient Muscular Dystrophy. *Am J Pathol.*, 2018 S0002-9440(17)31150-1.

-Sinadinou A, Young CN, Al-Khalidi R, Teti A, Kalinski P, Mohamad S, Floriot L, Henry T, Tozzi G, Jiang T, Wurtz O, Lefebvre A, Shugay M, Tong J, Vaudry D, Arkle S, doRego JC, Górecki DC: P2RX7 purinoceptor: a therapeutic target for ameliorating the symptoms of Duchenne muscular dystrophy. *PLoS Med* 2015, 12:e1001888.

-Sandonà D, Gastaldello S, Martinello T, Betto R: Characterization of the ATP-hydrolyzing activity of alpha-sarcoglycan. *Biochem J* 2004, 381:105-112.

-Rosenberg AS, Puig M, Nagaraju K, Hoffman EP, Villalta SA, Rao VA, Wakefield LM, Woodcock J. Immune-mediated pathology in Duchenne muscular dystrophy. *Science Translational Medicine*, 2015, 7(299):299rv4.

-Villalta SA, Rosenthal W, Martinez L, Kaur A, Sparwasser T, Tidball JG, Margeta M, Spencer MJ, Bluestone JA. Regulatory T cells suppress muscle inflammation and injury in muscular dystrophy. *Science Translational Medicine*, 2014, 6(258):258ra142.

Distrofia Muscolare dei cingoli di tipo 2D

Coordinator: Claudio Bruno

Duration (N. Years): 2

Starting year: 2017

Telethon Project (nr):

GGP17192

Disease Name:

Limb Girdle Muscular Dystrophy Type 2D (LGMD2D)

Keywords:

Limb Girdle Muscular Dystrophy, Inflammation, ATP