

## Poster P.10.83

### **MOTOR NEURON DEGENERATION IN SPINAL AND BULBAR MUSCULAR ATROPHY: MOLECULAR APPROACHES TO COUNTERACT MUTANT ANDROGEN RECEPTOR NEUROTOXICITY**

**Galbiati M.\*<sup>[1]</sup>**, Cristofani R.<sup>[1]</sup>, Cicardi M.E.<sup>[1]</sup>, Meroni M.<sup>[1]</sup>, Crippa V.<sup>[1]</sup>, Ferrari V.<sup>[1]</sup>, Tedesco B.<sup>[1]</sup>, Chierichetti M.<sup>[1]</sup>, Casarotto E.<sup>[1]</sup>, Messi E.<sup>[1]</sup>, Piccolella M.<sup>[1]</sup>, Pennuto M.<sup>[2]</sup>, Cescon M.<sup>[2]</sup>, Bonaldo P.<sup>[2]</sup>, Boido M.M.<sup>[3]</sup>, Vercelli A.<sup>[3]</sup>, Rusmini P.<sup>[1]</sup>, Poletti A.<sup>[1]</sup>

<sup>[1]</sup>Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, <sup>[2]</sup>Università degli Studi di Padova ~ Padova ~ Italy, <sup>[3]</sup>Università degli Studi di Torino ~ Torino ~ Italy

The neuromuscular disease Spinal bulbar muscular atrophy (SBMA) associates with loss of bulbar or spinal motoneurons and skeletal muscle atrophy. SBMA is caused by a mutation of the androgen receptor (AR) gene resulting in a protein with an elongated polyglutamine (polyQ) tract. ARpolyQ acquires nuclear toxicity after binding testosterone, which induces AR nuclear translocation and ARpolyQ misfolding. Misfolded ARpolyQ is prone to aggregate, a process counteracted by the protein quality control (PQC) system. This system comprises chaperones and the degradative pathways (proteasome and autophagy). Several data suggest that misfolded ARpolyQ is mainly processed via autophagy, and causes autophagy flux blockage. Restoration of a functional autophagy is beneficial to cells expressing misfolded ARpolyQ. A peculiar form of autophagy is the "chaperone-assisted selective autophagy" (CASA), which relies on dynein-mediated retrograde transport of the CASA (HSPB8-BAG3-HSC70-CHIP) complex. This complex binds misfolded ARpolyQ enhancing its clearance. In immortalized motoneurons (MNs) and MNs derived from SBMA iPSCs we found that inhibition of dynein-mediated retrograde transport reduces ARpolyQ accumulation enhancing its clearance. This process is mediated by the HSC70 co-chaperone BAG1 which activates a compensatory mechanism alternative to HSPB8/BAG3. In the knock-in ARQ113 SBMA mouse model (KIARQ113), we found that in affected muscle both BAG1 and BAG3 are upregulated, with an increased BAG3:BAG1 ratio which preferentially routes misfolded ARpolyQ to autophagy.

On these basis and on our previous in vitro studies, we tested bicalutamide (an antiandrogen which prevents AR nuclear translocation) and trehalose (an autophagy activator) in KIARQ113 mice. We found that mice survival was not significantly modified by the treatments, but an apparent positive trend was present. In Rotarod test KIARQ113 mice the impaired motor coordination was completely recovered by trehalose treatment. Bicalutamide administered at early stages worsened this phenotype (probably because of its anti-anabolic effects on muscle development), but recovered the motor coordination phenotype when administered at later stages (when muscle reached the adulthood stage). Grip strength test in KI mice showed decreased forelimb muscle force, which was further decreased by early, but not late bicalutamide treatment. Histochemical analyses of mouse gastrocnemius reveal no variation associated to treatments in Feret min and max diameter of the KI mouse muscle fibers. Molecular analyses of gastrocnemius muscle of treated mice showed an increased PGC1 $\alpha$  expression, paralleled by an increased mitochondrial DNA content and enhanced mitochondrial complex levels (particularly of complex V - ATP synthase subunits and complex III). Thus, the combined trehalose/bicalutamide treatment ameliorates muscle energy production and counteracts ARpolyQ mediated toxicity in vivo.

LA MORTE DEL MOTONEURONE NELL'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE E BULBARE: APPROCCI MOLECOLARI PER CONTRASTARE LA TOSSICITÀ DEL RECETTORE DEGLI ANDROGENI MUTATO

L'atrofia muscolare spinale e bulbare (SBMA) è una malattia neuromuscolare in cui si ha perdita di motoneuroni a livello del bulbare e spinale con danni del muscolo scheletrico. La SBMA è dovuta alla mutazione del recettore degli androgeni che acquisisce un tratto poliglutamminico più lungo (ARpolyQ) di quello normalmente presente. L'ARpolyQ diventa tossico nel nucleo dopo il legame con testosterone che porta a conformazioni aberranti (misfolding) di ARpolyQ, che tende ad aggregare. L'aggregazione viene bloccata dal sistema di controllo di qualità proteico (PQC), che tuttavia risulta malfunzionante nella SBMA. Il potenziamento del sistema PQC migliora la rimozione di ARpolyQ misfoldato dalle cellule. Noi abbiamo identificato alcuni composti in grado di potenziare una via del sistema PQC, denominata "autofagia selettiva assistita da chaperone" (CASA), che comprende proteine quali HSPB8 e BAG3 coinvolte nella formazione del complesso CASA. Questi composti potenziano l'espressione di HSPB8, quindi del complesso CASA, e favoriscono la rimozione di ARpolyQ mutato.

In modelli animali di SBMA, abbiamo testato uno di questi, il trealosio, (noto attivatore dell'autofagia), con bicalutamide (antiandrogeno che mantiene l'ARpolyQ nel citoplasma dove avviene l'autofagia). Lo studio ha mostrato una tendenza all'aumento della sopravvivenza dell'animale sottoposto ai trattamenti (ma non significativa) e un recupero della coordinazione motoria e, in parte, della forza muscolare. Tuttavia, i trattamenti non hanno migliorato significativamente l'atrofia muscolare tipica dei modelli animali di SBMA, ma hanno aumentato le funzionalità mitocondriali nel muscolo, quindi dei processi che regolano l'energia cellulare. Su queste basi, riteniamo che il trattamento combinato possa servire a migliorare il quadro clinico di pazienti SBMA.

Synergic pro-degradative activity of trehalose and bicalutamide on the mutant Androgen Receptor responsible for Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Giorgetti E., Rusmini P., Crippa V., Cristofani R., Boncoraglio A., Cicardi M.E., Galbiati M., Poletti A\*. *Hum Mol Genet* (2015) 24(1):64-75. doi: 10.1093/hmg/ddu419 PMID: 25122660

Human Adipose-derived Mesenchymal Stem Cells as a new model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Dossena M., Bedini G., Rusmini P., Canazza A., Giorgetti E., Tosetti V., Salsano E., Sagnelli A., Navone S., Marfia G., Alessandri G., Corsi F., Fischbeck K.H., Parati E.A., Pareyson D., Poletti A\*. *Plos ONE* (2014) 9(11):e112746 doi: 10.1371/journal.pone.0112746 PMID: 25392924

Aberrant autophagic response in the muscle of a knock-in mouse model of Spinal and Bulbar Muscular Atrophy. Rusmini P., Polanco M.J., Cristofani R., Cicardi M.E., Meroni M., Galbiati M., Piccolella M., Messi E., Giorgetti E., Lieberman A., Milioto C., Rocchi A., Aggarwal T., Pennuto M., Crippa V., Poletti A\*. *Sci Rep.* 5, 15174; doi: 10.1038/srep15174 (2015). DOI: 10.1038/srep15174 PMID: 26490709

210th ENMC International Workshop: Research and clinical management of patients with spinal and bulbar muscular atrophy. M. Pennuto, L. Greensmith, P. Pradat, G. Sorarù, A. Baniahmad, M. Basso, A. Cato, K. Fischbeck, J. Finsterer, P. Fratta, I. Gozes, M. Jokela, D. Pareyson, A. Poletti, C. Rinaldi, X. Salvatella, J. Vissing, P. Weydt. *Neuromuscular Disord* (2015) 25(10):802-12. Doi: 10.1016/j.nmd.2015.06.462

Transcriptional induction of the heat shock protein B8 mediates the clearance of misfolded proteins responsible for motor neuron diseases. Crippa V., D'Agostino V.G., Cristofani R., Rusmini P., Cicardi M.E., Messi E., Loffredo R., Pancher M., Piccolella M., Galbiati M., Meroni M., Cereda C., Carra S., Provenzani A., Poletti A\*. *Sci Rep.* 6, 22827; doi: 10.1038/srep22827 (2016). DOI: 10.1038/srep22827 PMID: 26961006

Exome sequencing identifies variants in two genes encoding the LIM-proteins NRAP and FHL1 in an Italian patient with BAG3 myofibrillar myopathy. D'Avila F., Meregalli M., Lupoli S., Barcella M., Orro A., De Santis F., Sitzia C., Farini A., D'Ursi P., Erratico S., Cristofani R., Milanese L., Braga D., Cusi D., Poletti A., Barlassina C., Torrente Y. *J Muscle Res Cell Motil.* (2016) 37(3):101-15 DOI: 10.1007/s10974-016-9451-7 PMID: 27443559

A surveillance function of the HSPB8-BAG3-HSP70 chaperone complex ensures stress granule integrity and dynamism. Ganassi M., Mateju D., Bigi I., Mediani L., Poser I., Lee H.O., Seguin S.J., Morelli F.F., Vinet J., Leo G., Pansarasa O., Cereda C., Poletti A., Alberti S., Carra S. *Mol Cell* (2016) 63, 796–810 doi: 10.1016/j.molcel.2016.07.021 PMID: 27570075

The Role of the protein quality control system in SBMA. Rusmini P., Crippa V., Cristofani R., Rinaldi C., Cicardi M.E., Galbiati M., Carra S., Malik B., Greensmith L., Poletti A. *J Mol Neurosci* (2016) 58(3), 348-364. DOI: 10.1007/s12031-015-0675-6. PMID: 26572535

The Role of the Heat Shock Protein B8 (HSPB8) in Motoneuron Diseases. Rusmini P., Cristofani R., Galbiati M., Cicardi M.E., Ferrari V., Vezzoli G., Tedesco B., Messi E., Piccolella M., Carra S., Crippa V., Poletti A. *Front Mol Neurosci* (2017) 10:176. doi: 10.3389/fnmol.2017.00176.

Inhibition of retrograde transport modulates misfolded protein accumulation and clearance in motoneuron diseases. Cristofani R., Crippa V., Rusmini P., Cicardi M.E., Meroni M., Licata N.V., Sala G., Giorgetti E., Grunseich C., Galbiati M., Piccolella M., Messi E., Ferrarese C., Carra S., Poletti A\*. *Autophagy* (2017) 13(8):1280-1303. doi: 10.1080/15548627.2017.1308985. PMID: 28402699

Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation, in models of motoneuron degeneration. Rusmini P., Cortese K., Crippa V., Cristofani R., Cicardi M. E., Ferrari V., Vezzoli G., Tedesco B., Meroni M., Messi E., Piccolella M., Galbiati M., Garrè M., Morelli E., Vaccari T., Poletti A. *Autophagy* (2019) 15:631-651. DOI: 10.1080/15548627.2018.1535292. PMID: 30335591

Autophagic and proteasomal mediated removal of mutant androgen receptor in muscle models of spinal and bulbar muscular atrophy. Cicardi M.E, Cristofani R., Crippa V., Ferrari V., Tedesco B., Casarotto E., Chierichetti M., Galbiati M., Piccolella M., Messi E., Carra S. , Pennuto M., Rusmini P., Poletti A. *Frontiers Endocrinol* (2019). DOI: 10.3389/fendo.2019.00569

The regulation of the small heat shock protein B8 in misfolding protein diseases causing motoneuronal and muscle cell death. Cristofani R., Rusmini P., Galbiati M., Cicardi M.E., Ferrari V., Tedesco B., Casarotto E., Chierichetti M., Messi E., Piccolella M., Carra S., Crippa V., Poletti A. *Front Neurosci, section Neuropharmacology* (2019) in press. DOI: 10.3389/fnins.2019.00796

The role of sex and sex Hormones in Neurodegenerative Diseases. Vegeto E., Villa A., Dalla Torre S., Crippa V. Rusmini P., Cristofani R., Galbiati M., Maggi A., Poletti A. *Endocrine Rev.* (2019) In press

Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare

Coordinator: Angelo Poletti

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2014

**Telethon Project (nr):**

GGP14039

**Disease Name:**

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA)

**Keywords:**

Androgen receptor, polyglutamine, motoneuron