

REPORT INTERMEDIO DEL PROGETTO – Anno 1

Titolo del progetto: Targeting della 'trained immunity' nella DMD

Background

La risposta immunitaria innata svolge un ruolo importante nella patogenesi della distrofia muscolare di Duchenne (DMD), contribuendo al danno e all'infiammazione cronica nel muscolo.

La trained immunity (TI) è una forma di memoria delle cellule immunitarie innate, come i monociti, che si sviluppa in seguito all'esposizione a diversi stimoli, inclusi quelli rilasciati dal muscolo danneggiato. In risposta a una seconda esposizione, allo stesso stimolo o a uno diverso, i monociti producono quantità elevate di citochine infiammatorie. L'induzione della TI dipende dall'attivazione del complesso mTOR (mammalian target of rapamycin) e si basa su una riprogrammazione epigenetica e metabolica dei progenitori mieloidi nel midollo osseo e nella milza, dando origine a monociti iper-reattivi. Se da un lato TI risulta utile durante le infezioni, dall'altro, in malattie infiammatorie croniche come la distrofia muscolare di Duchenne (DMD), un'attivazione eccessiva è associata a un peggioramento della patologia. Pertanto, la TI rappresenta un potenziale bersaglio terapeutico di grande interesse per modulare specificamente l'attivazione eccessiva dei monociti nella DMD.

Obiettivo specifico

Nanobiologici a base di apolipoproteina A1 (apoA-I) contenenti rapamicina (mTORi-NBs) permettono di mirare in modo specifico la TI nei monociti del midollo osseo e della milza attraverso l'inibizione di mTOR.

L'obiettivo principale di questo progetto è indagare se la modulazione mirata della trained immunity nei monociti mediante nanoparticelle mTORi basate su apoA-I possa rappresentare un approccio terapeutico innovativo per la DMD, in grado di rallentare la degenerazione muscolare e promuovere la rigenerazione muscolare. A tal fine, abbiamo trattato i topi *mdx*, modello murino di DMD, con iniezioni intravenose bisettimanali di mTORi-NBs, a partire dall'età di 4-6 settimane, per due settimane, e analizzato l'effetto del trattamento sulla TI nei monociti isolati da milza e midollo osseo, nonché sulla patologia muscolare distrofica.

Risultati

I nostri risultati mostrano che i monociti isolati dal midollo osseo e dalla milza di topi *mdx* producono quantità elevate di citochine infiammatorie rispetto ai monociti di topi sani, confermando che il danno muscolare distrofico induce TI. Inoltre, rispetto alla TI indotta da lesione muscolare acuta in topi sani, quella associata a danno muscolare distrofico porta a una produzione di citochine eccessiva e/o disregolata da parte dei monociti. Il trattamento con mTORi-NBs **ha inibito la TI nei monociti, riequilibrando la produzione di citochine**. Tale inibizione ha determinato un **miglioramento della rigenerazione muscolare** e a una **riduzione della fibrosi** (manoscritto in preparazione). Inoltre, la coltura dei progenitori fibroadipogenici (FAPs), cellule responsabili della fibrosi e dell'accumulo di grasso nel muscolo distrofico, con fattori solubili rilasciati da monociti provenienti da topi trattati ha portato a una marcata inibizione della differenziazione dei FAPs in adipociti.

L'impatto dei risultati e sviluppi futuri

I risultati finora ottenuti sono promettenti e suggeriscono che il targeting della TI nel DMD potrebbe rappresentare una nuova strategia terapeutica per il trattamento della patologia, migliorando la rigenerazione e rallentando la progressione della malattia attraverso la riduzione della fibrosi. Nella seconda parte del progetto intendiamo studiare gli effetti del trattamento sulla funzione muscolare, sul microambiente delle cellule staminali muscolari, sull'accumulo di grasso e sulla fibrosi, anche in topi più anziani. Infine, prevediamo di verificare la presenza di TI nei monociti isolati dal sangue periferico di pazienti con DMD.

Contact information:

Biliana Lozanoska-Ochser, PhD

Associate Professor of Histology and Embryology

UniCamillus - Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences

E-mail: biliana.lozanoskaochser@unicamillus.org

PROJECT REPORT – Year 1

Project title: Targeting trained immunity in DMD

Background

The innate immune response plays an important role in the pathogenesis of Duchenne muscular dystrophy (DMD), contributing to chronic muscle injury and inflammation.

Trained immunity (TI) is a type of innate immune cell memory induced following exposure to various stimuli, including those released from damaged muscle. It is characterized by a hyperactive functional state of innate immune cells, such as inflammatory monocytes, which following a secondary exposure to the same or different stimulus produce elevated amounts of inflammatory cytokines. The TI phenotype is dependent on the activation of the mammalian target of rapamycin (mTOR) and relies on epigenetic and metabolic reprogramming at the level of myeloid progenitors in the bone marrow and the spleen, giving rise to hyper-responsive monocytes. While beneficial during infection, excessive activation of TI in the context of chronic inflammatory diseases such as DMD has been associated with worsening of the pathology. Therefore, TI represents a compelling target to specifically modulate excessive activation of monocytes in DMD.

Study objectives and design

Apolipoprotein A1 (apoA-I)-based, rapamycin-loaded nanobiologics (mTORi-NBs) specifically target TI in monocytes within the bone marrow and the spleen through the inhibition of mTOR and have been used successfully and safely in other chronic inflammatory diseases.

The main objective of this project is to investigate whether targeting TI specifically in monocytes could represent a novel therapeutic modality in DMD, able to decelerate muscle degeneration, and promote muscle regeneration. To this end, we treated *mdx* mice, the mouse model of DMD, with twice weekly intravenous injections of apoA-I-based mTORi-nanoparticles, at the age of 4-6 weeks, for two weeks and analyzed the effect of the treatment on TI in monocytes isolated from the spleen and bone marrow, and on dystrophic muscle pathology.

Results

Our results show that monocytes isolated from the bone marrow and spleen of *mdx* mice produce elevated amounts of inflammatory cytokines following their differentiation into macrophages and stimulation *in vitro* compared to monocytes from healthy mice, confirming that dystrophic muscle injury induces TI. Furthermore, compared to TI induced by acute muscle injury in healthy mice, TI associated with chronic muscle injury leads to excessive and/or dysregulated cytokine production by monocyte-derived macrophages. Treatment with mTORi-NBs **inhibited TI in splenic and bone marrow monocytes**, balancing the cytokines produced. This inhibition resulted in **improved dystrophic muscle regeneration** and **reduced fibrosis** (manuscript in preparation). Interestingly, culture of fibro-adipogenic progenitors (FAPs), the cells responsible for fibrosis and fat accumulation in dystrophic muscle, with soluble factors released by monocyte-derived macrophages isolated from mTORi-NBs treated mice resulted in a marked **inhibition of FAPs differentiation into adipocytes**.

Impact and future developments

The results up to now are promising and suggest that targeting TI specifically in monocytes in DMD could represent a novel approach in the treatment of DMD pathology, improving regeneration and halting disease progression by reducing muscle fibrosis. In the second part of this project, we will investigate the broader effects of the treatment on muscle function, the muscle stem cell niche, fat accumulation and fibrosis, also in older mice. Finally, we plan to verify the presence of TI in monocytes isolated from peripheral blood of DMD patients

Contact information:

Biliana Lozanoska-Ochser, PhD

Associate Professor of Histology and Embryology

UniCamillus - Saint Camillus International University of Health and Medical Sciences

E-mail: biliana.lozanoskaochser@unicamillus.org

Phone: +39 331 701 2024