

Poster P.10.82

ALTERNATIVE TRANSLATION INITIATION AS A NOVEL STRATEGY TO BLOCK TOXICITY OF THE MUTANT ANDROGEN RECEPTOR IN SBMA

Cristofani R.*^[1], Rusmini P.^[1], Galbiati M.^[1], Crippa V.^[1], Chierichetti M.^[1], Ferrari V.^[1], Tedesco B.^[1], Casarotto E.^[1], Pennuto M.^[2], Poletti A.^[1]

^[1]Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[2]Università degli Studi di Padova ~ Padova ~ Italy

Spinobulbar Muscular Atrophy (SBMA) is an adult onset neuromuscular disease, which only affects males and it is caused by an expansion of a triplet CAG repeat sequence present in exon 1 of the androgen receptor (AR) gene. This sequence encodes an elongated polyglutamine tract (ARpolyQ) in the N-terminus of the AR protein, which has been proved to confer toxicity to the ARpolyQ, when this is activated in response to the binding which circulating androgens, the male sex hormonal steroids.

The therapeutic attempt testes so far for SBMA are based on strategies aimed to block androgen production and/or activity, as well as on AR down-regulation. The main side effect of these approaches are the appearance of relevant undesired endocrine dysfunction in male patients.

In this project, we proposed a novel therapeutic approach, which is aimed to “repair” the mutant AR by removing its toxic polyQ tract, without causing an AR loss of function.

To this aim we will test the possibility to enhance the synthesis of an AR isoform devoid of toxic polyQ tract, preventing the translation of the neurotoxic ARpolyQ. We will take advantage of the presence of an AUG translation start codon in the AR mRNA, which is located downstream the pathogenic CAG repeat. The use of this AUG leads to the production of an AR isoform (AR-A), which retains its androgenic activity, but lacks toxicity because is devoid of the elongated polyQ tract.

We therefore subdivided the project in three aims focused:

- to study AR-A and ARpolyQ levels during development and disease manifestation in SBMA mice, differentiated human SBMA iPSCs and muscle tissues of SBMA patients;
- to characterize crucial androgenic properties of AR-A comparing them with ARpolyQ;
- to develop an effective strategy to selectively drive AR-A translation in motoneurons and muscle cells. The shifting of translation from ARpolyQ to AR-A will be attempted via antisense oligonucleotide (ASO), phosphorodiamidate morpholino oligo (PMO), Locked nucleic acids (LNA) and a library of FDA-approved drugs and natural compounds;
- to test if the positive hits are active in human SBMA iPSCs derived motoneurons or muscle cells and SBMA flies.

We expect to impose AR initiation of translation at the II-AUG thus skipping the polyQ and produce nontoxic AR-A, thus decreasing the total amount of toxic ARpolyQ, without reducing the overall AR activity in target cells. This will provide a safe and tolerable potential treatment for SBMA patients.

INIZIO ALTERNATIVO DELLA TRADUZIONE COME NUOVA STRATEGIA PER BLOCCARE LA TOSSICITA' DEL RECETTORE DEGLI ANDROGENI MUTATO NELL'ATROFIA MUSCOLARE SPINALE E BULBARE (SBMA).

La SBMA è una rara malattia monogenica che colpisce i motoneuroni e il tessuto muscolare in soggetti adulti di sesso maschile. La malattia è dovuta alla mutazione di una sequenza ripetuta di una tripletta di nucleotidi citosina-adenina-guanina (CAG) presente nell'esone 1 del gene del recettore degli androgeni (AR), normalmente di lunghezza variabile tra 20-25 ripetizioni nei soggetti sani e che risulta espansa ad oltre 36 ripetizioni nel paziente SBMA. Questa sequenza di nucleotidi viene tradotta

in una sequenza allungata di aminoacidi di glutammina (tratto polyglutamminico, polyQ) nella proteina risultante di AR (ARpolyQ nel caso della forma mutata). La presenza di questa sequenza allungata di polyQ conferisce tossicità all'AR, ma solo quanto questo viene legato ed attivato dal suo ligando naturale testosterone. Queste osservazioni hanno spinto a ricercare farmaci capaci di inibire la produzione del AR o del suo ligando, che però posseggono considerevoli effetti collaterali di tipo endocrino.

In questo progetto abbiamo proposto un approccio innovativo che si avvantaggia dalla particolare struttura del gene dell'AR e del suo messaggero (RNA) utilizzato dalle cellule per produrre la proteina ARpolyQ tossica.

L'AR viene normalmente prodotto partendo da una sequenza di inizio chiamata AUG. Da questa sequenza la traduzione del messaggero (RNA) a proteina porta quasi immediatamente all'inserimento della sequenza tossica polyQ. Esiste però una seconda sequenza di inizio AUG, che si trova a valle dalla regione utilizzata per produrre il polyQ. Iniziando la produzione di AR da questa seconda sequenza di inizio AUG, si ottiene la formazione di un AR più corto, che però mantiene la sua attività, perdendo la sequenza tossica di polyQ.

Il nostro progetto ha lo scopo di comparare l'attività della forma lunga e corta di AR nei vari tessuti e di testare approcci generici e/o farmacologici che possano favorire la sintesi della forma corta di AR prova del polyQ e quindi della tossicità. L'identificazione di composti capaci di favorire questa nuova traduzione potrebbe originare farmaci con un grande potenziale terapeutico per la SBMA.

Rusmini P, Cortese K, Crippa V, Cristofani R, Cicardi ME, Ferrari V, Vezzoli G, Tedesco B, Meroni M, Messi E, Piccolella M, Galbiati M, Garre M, Morelli E, Vaccari T, Poletti A. Trehalose induces autophagy via lysosomal-mediated TFEB activation in models of motoneuron degeneration. *Autophagy*. 2018 Oct 18;(in press):1-21. doi: 10.1080/15548627.2018.1535292. PubMed PMID: 30335591.

Cristofani R, Crippa V, Rusmini P, Cicardi ME, Meroni M, Licata NV, Sala G, Giorgetti E, Grunseich C, Galbiati M, Piccolella M, Messi E, Ferrarese C, Carra S, Poletti A. Inhibition of retrograde transport modulates misfolded protein accumulation and clearance in motoneuron diseases. *Autophagy*. 2017 Aug 3;13(8):1280-1303. doi: 10.1080/15548627.2017.1308985. PubMed PMID: 28402699.

Zboray L, Pluciennik A, Curtis D, Liu Y, Berman-Booty LD, Orr C, Kesler CT, Berger T, Gioeli D, Paschal BM, Merry DE. Preventing the Androgen Receptor N/C Interaction Delays Disease Onset in a Mouse Model of SBMA. *Cell reports*. 2015 Dec 15;13(10):2312-23. doi: 10.1016/j.celrep.2015.11.019. PubMed PMID: 26673324.

Poletti A. The polyglutamine tract of androgen receptor: from functions to dysfunctions in motor neurons. *Front Neuroendocrinol*. 2004 Apr;25(1):1-26. doi: 10.1016/j.yfrne.2004.03.001. PubMed PMID: 15183036; eng.

Montie HL, Cho MS, Holder L, Liu Y, Tsvetkov AS, Finkbeiner S, Merry DE. Cytoplasmic retention of polyglutamine-expanded androgen receptor ameliorates disease via autophagy in a mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. *Human molecular genetics*. 2009 Jun 1;18(11):1937-50. doi:10.1093/hmg/ddp115. PubMed PMID: 19279159; eng.

Simeoni S, Mancini MA, Stenoien DL, Marcelli M, Weigel NL, Zanisi M, Martini L, Poletti A. Motoneuronal cell death is not correlated with aggregate formation of androgen receptors containing an elongated polyglutamine tract. *Human molecular genetics*. 2000 Jan 1;9(1):133-44. PubMed PMID: 10587588; eng.

Mizokami A, Chang C. Induction of translation by the 5'-untranslated region of human androgen receptor mRNA. *The Journal of biological chemistry*. 1994;269(41):25655-25659.

Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are present in human genital skin fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1994 Feb 15;91(4):1234-8. PubMed PMID: 8108393.

Wilson CM, McPhaul MJ. A and B forms of the androgen receptor are expressed in a variety of human tissues. *Molecular and cellular endocrinology*. 1996 Jun 18;120(1):51-7. PubMed PMID: 8809738.

Atrofia Muscolare Spinale e Bulbare

Coordinator: Angelo Poletti

Partner: Maria Pennuto

Duration (N. Years): 3

Starting year: 2019

Telethon Project (nr):

GGP19128

Disease Name:

Spinal and Bulbar Muscular Atrophy (SBMA)

Keywords:

Androgen receptor, polyglutamine, motoneuron