



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Developing genetic therapies for polyglutamine disorders

Evers, M.M.

### Citation

Evers, M. M. (2015, January 7). *Developing genetic therapies for polyglutamine disorders*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/30254>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/30254>

**Note:** To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/30254> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Evers, Melvin Maurice

**Title:** Developing genetic therapies for polyglutamine disorders

**Issue Date:** 2015-01-07

# Samenvatting

Polyglutamine (polyQ) ziekten is een groep van negen neurodegeneratieve aandoeningen die allen worden veroorzaakt door een verlengde CAG herhaling resulterend in een extra schadelijke polyQ eiwitfunctie. Hoe langer deze CAG herhaling, des te eerder de ziekte zich manifesteert. In de meeste gevallen begint de ziekte rond middelbare leeftijd. Hoewel alle polyQ ziekten veroorzaakt worden door een mutatie in één gen, en er de laatste decennia veel onderzoek gedaan is, zijn er tot dusverre geen therapieën beschikbaar die de ziekte genezen of vertragen.

In **hoofdstuk 1** wordt een kort overzicht gegeven van de polyQ aandoeningen en worden de ziekte-veroorzakende polyQ eiwitten en hun rol in de ziektemechanismen beschreven. De meest voorkomende en best bestudeerde polyQ aandoeningen, de ziekte van Huntington (ZvH) en spinocerebellaire ataxie type 3 (SCA3) en de moleculaire biologie van hun ziekteverwekkende huntingtine en ataxine-3 worden beschreven.

Vervolgens zijn in **hoofdstuk 1** de mogelijkheden voor genetische therapieën voor polyQ aandoeningen besproken, met de nadruk op wat kan worden geleerd van andere neurodegeneratieve aandoeningen waarvoor genetische therapieën in ontwikkeling zijn of al worden gebruikt als therapie. Kleine moleculen, zogenaamde antisense oligonucleotiden, worden algemeen gebruikt als potentiële behandeling voor neurodegeneratieve ziekten. Afhankelijk van de specifieke chemische modificaties en plaats waarop het bindt kunnen antisense oligonucleotiden de expressie verlagen of polyQ eiwitten modificeren. De beperkingen en mogelijkheden van de toediening van antisense oligonucleotiden in de hersenen en het bereiken van de getroffen zenuwcellen wordt besproken.

Ondanks het vele onderzoek naar de onderliggende polyQ ziektemechanismen, blijft de kennis over regulering en expressie van mRNA en eiwit beperkt. **Hoofdstuk 2** beschrijft subtiele verschillen in huntingtine mRNA en eiwit expressie in ZvH. In volwassen ZvH is iets minder mutant huntingtine mRNA, maar gelijke hoeveelheden wild-type en mutant huntingtin eiwit hoeveelheden gevonden. Juveniele ZvH proefpersonen vertoonden minder mutant huntingtin eiwit vergeleken met wild-type huntingtine eiwit. Dit duidt op verschillen in huntingtine eiwitexpressie tussen volwassen ZvH en juveniel ZvH.

In **hoofdstuk 3** worden CUG triplet antisense oligonucleotiden gebruikt om, in van polyQ patiënten verkregen fibroblasten, specifiek mutant polyQ transcripten en eiwit te verminderen. Een vermindering van wild-type CAG transcript niveaus werd ook waargenomen, maar deze afname was minder opvallend dan voor het mutant mRNA. Andere niet verlengde CAG triplet bevattende transcripten waren niet verminderd, wat de specificiteit van de CUG triplet antisense oligonucleotide voor het mutant mRNA bevestigt. **Hoofdstuk 2** beschrijft dat de basale niveaus van mutant huntingtin mRNA en mutant huntingtine eiwit gelijk of lager zijn in vergelijking met wild-type. Dit bevestigt de potentie van genterapieën die niet geheel specifiek voor het mutante huntingtine allel, zoals de CUG triplet antisense oligonucleotide.

Naast het doelgericht aanpakken van verlengde CAG triplet transcripten om de translatie van mutant polyQ eiwit te verminderen, beschrijft **hoofdstuk 4** het verwijderen van motieven die betrokken zijn bij de vorming van toxische polyQ fragmenten. Tijdens het aggregatieproces worden oplosbare polyQ fragmenten gegenereerd door het proteolytisch knippen van volledige polyQ eiwitten. Deze polyQ fragmenten worden beschouwd als de belangrijkste schadelijke entiteiten voor het ontstaan van neurodegeneratie. In de ZvH is reeds aangetoond dat het verwijderen van een proteolytische knipplaats, wat betrokken is bij de vorming van huntingtine polyQ fragmenten, leidt tot verminderde toxiciteit. **Hoofdstuk 4** beschrijft een mogelijke therapeutische benadering door middel van antisense oligonucleotiden die ervoor zorgen dat exon 12 uit het huntingtine mRNA verwijderd wordt. Deze antisense oligonucleotide geïnduceerde eiwitmodificatie resulteert in een huntingtine eiwit wat de knipplaats mist en wat vervolgens leidt tot verminderde vorming van toxische huntingtine polyQ fragmenten. Deze eerste studie beschrijft een compleet nieuwe aanpak voor het verminderen van de toxiciteit van mutant huntingtine door niet de expressieniveaus te verminderen, maar door het polyQ eiwit te modificeren.

Een meer directe genetische benadering om de polyQ geïnduceerde toxiciteit te verminderen is in **hoofdstuk 5** beschreven. Hier wordt het verwijderen van de toxische polyQ herhaling uit het ataxine-3 eiwit door middel van het verwijderen van exonen met behulp van antisense oligonucleotiden beschreven. Twee verschillende benaderingen werden aangedragen met hetzelfde doel, het verwijderen van het verlengde CAG triplet bevattende exon. Beide benaderingen resulteren in gemodificeerd ataxine-3 eiwit wat de toxische polyQ verlenging mist. Het gemodificeerde ataxine-3 eiwit mist slechts een klein deel en behoudt belangrijke wild-type functies van het eiwit.

De haalbaarheid van de in **hoofdstuk 4 en 5** beschreven antisense oligonucleotiden is *in vivo* aangetoond door antisense oligonucleotiden direct in de hersenen van muizen te injecteren. De in dit proefschrift beschreven *in vivo* en *in vitro* resultaten suggereren dat antisense oligonucleotiden gericht tegen de verlengde CAG triplet rechtstreeks en het verwijderen van exonen veelbelovende therapeutische benaderingen zijn om de polyQ geïnduceerde toxiciteit te verminderen in de ZvH, SCA3 en andere polyQ aandoeningen.

In **hoofdstuk 6** zijn de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift samengevat. Recente ontwikkelingen worden beschreven en gerelateerd aan de verkregen resultaten beschreven in dit proefschrift. Daarnaast wordt er een blik in de toekomst geworpen hoe voor polyQ patiënten klinische studies met genetische therapieën zoals antisense oligonucleotiden behandelingen op te zetten.

Dit proefschrift beschrijft enkele nieuwe genetische therapieën voor polyQ aandoeningen welke gericht zijn op het verminderen en/of modificeren van polyQ ziekte-veroorzakende eiwitten. Hoewel uitgebreid *in vitro* en *in vivo* onderzoek nodig is om toxische bijwerkingen van de verschillende antisense oligonucleotiden en de resulterende gemodificeerde eiwitten uit te sluiten, zijn deze preklinische antisense oligonucleotide behandelingen veelbelovend als mogelijke therapeutische behandelingen voor polyQ aandoeningen.