



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Developing an antisense oligonucleotide treatment for Spinocerebellar Ataxia Type 3

Toonen, L.J.A.

Citation

Toonen, L. J. A. (2018, May 31). *Developing an antisense oligonucleotide treatment for Spinocerebellar Ataxia Type 3*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/62616>

Version: Not Applicable (or Unknown)

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

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/62616>

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

Cover Page



Universiteit Leiden

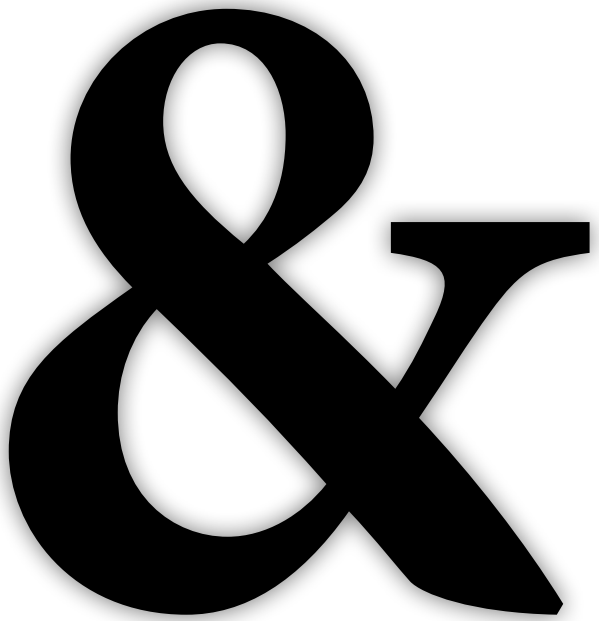


The handle <http://hdl.handle.net/1887/62616> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Toonen, L.J.A.

Title: Developing an antisense oligonucleotide treatment for Spinocerebellar Ataxia Type 3

Issue Date: 2018-05-31



Nederlandse samenvatting
List of publications
Curriculum Vitae
Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Spinocerebellaire ataxie type 3 (SCA3) is een erfelijke neurodegeneratieve aandoening waarbij de symptomen zich meestal tussen het 30^e en 50^e levensjaar presenteren. Met name de hersenstam en het cerebellum (de kleine hersenen) worden aangetast tijdens het SCA3 ziekteproces. Met een incidentie van ongeveer 1:100.000 is SCA3 vrij zeldzaam, maar komt wel over de gehele wereld voor. SCA3 is uiteindelijk fataal en er is momenteel geen medicijn dat de ziekte kan vertragen of voorkomen. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift is gericht op het onderzoeken van antisense oligonucleotiden (AONs) als potentiële behandeling voor SCA3.

In **hoofdstuk 1** worden de ziekte veroorzakende mechanismen van SCA3 beschreven. SCA3 behoort tot de zogenaamde polyglutamine (polyQ) aandoeningen, welke veroorzaakt worden door eenzelfde soort verandering: een verlenging van een CAG herhaling in de coderende regio van een gen. Bij SCA3 ligt de verlengde CAG herhaling in het *ATXN3* gen en is deze verlengd tot meer dan 50 herhalingen. De CAG herhaling in het DNA wordt in de cel vertaald naar een glutamine aminozuur in het ataxine-3 eiwit. Het veranderde ataxine-3 eiwit zorgt met name in hersencellen voor problemen, welke zich uiteindelijk manifesteren als de symptomen van SCA3. De exacte manier waarop het mutante ataxine-3 eiwit in de cel voor toxiciteit zorgt is nog niet achterhaald, maar er zijn wel een aantal mechanismen bekend. Zo is ontdekt dat het mutante ataxine-3 eiwit door enzymen in de cel wordt geknipt waardoor korte eiwitfragmenten, die de polyQ regio bevatten, vrijkomen. Deze korte eiwitfragmenten zijn schadelijker voor cellen dan het volledige ataxine-3 eiwit en spelen dus mogelijk een belangrijke rol bij het veroorzaken van de cellulaire toxiciteit. Daarnaast is bekend dat er in hersencellen van SCA3 patiënten ataxine-3 eiwitklonten ontstaan. Het is momenteel niet duidelijk of deze eiwitklonten bijdragen aan toxiciteit in de hersencellen, of dat de eiwitklonten juist ontstaan ter bescherming van de cel. Verder is gebleken dat mutant ataxine-3 leidt tot verstoring van de eiwitafbraak in de cel, door inhibitie van het proteasoom en autofagie, wat dus ook bij kan dragen aan de ophoping van ataxine-3 eiwitklonten.

Omdat SCA3 wordt veroorzaakt door een bekende genetische verandering, is de aandoening een goede kandidaat voor genetische therapieën. Een van de genetische therapieën waarvan de klinische toepassingen in de laatste jaren grote ontwikkelingen heeft doorgemaakt zijn de antisense oligonucleotiden (AONs). In **hoofdstuk 2** worden deze moleculen uitgebreid besproken in de context van het centrale zenuwstelsel. Het grote voordeel van het behandelen van het centrale zenuwstelsel met AONs is dat deze moleculen goed worden opgenomen door hersencellen en tevens maanden aanwezig en actief blijven in de cel. AONs bestaan uit kunstmatige stukjes DNA of RNA, welke op verschillende manieren met RNA kunnen interacteren. Zo kunnen AONs een bepaald RNA in de cel laten afbreken zodat het eiwit dat hieruit gecodeerd wordt, niet meer gevormd wordt. In dit proefschrift wordt echter onderzoek gedaan naar een AON toepassing waarbij de splicing van het RNA wordt beïnvloed. Bij het proces van splicing wordt bepaald welke exonen (de coderende regio's van het DNA) worden vertaald naar eiwit. AONs kunnen de splicingsignalen in exonen maskeren, zodat dit exon uit

het RNA wordt gespliced. Deze techniek, het zogenaamde exon skippen, kan er zo dus voor zorgen dat vorming van bepaalde eiwitregio's wordt voorkomen.

In **hoofdstuk 3** hebben we een AON gebaseerde exon skip strategie onderzocht die erop gericht is om het enzymatisch knippen van ataxine-3 in de cel te verminderen. Wanneer het mutante ataxine-3 namelijk niet meer geknipt wordt, zullen de toxische polyQ fragmenten van ataxine-3 niet meer vrijkomen. Om dit teweeg te brengen, hebben we AONs ontworpen tegen exon 8 en 9 van het *ATXN3* gen, welke de toxische proteolytische kniplocaties in het ataxine-3 eiwit coderen. AON gemedieerde skip van exon 8 en 9 leidde inderdaad tot vorming van het verwachte gemodificeerde ataxine-3 eiwit. De AON efficiëntie was echter laag, dus de functionele tests met het gemodificeerde eiwit zijn met constructen en gezuiverd eiwit productie technieken onderzocht. Uit proteolytische reacties met caspase en calpaine-2 enzymen bleek dat het gemodificeerde ataxine-3 eiwit inderdaad resistenter was voor caspase degradatie, maar er werd geen effect op calpaine-2 proteolyse van ataxine-3 vastgesteld. Uit dit onderzoek concluderen we dan ook dat het skippen van exon 8 en 9 van *ATXN3* waarschijnlijk geen goede therapeutische strategie is.

Voordat AON gebaseerde therapeutische strategieën getest kunnen worden in patiënten, moet de validiteit van de aanpak eerst bewezen worden in diermodellen. Het eerste testmodel hiervoor is veelal een transgene muis en in **hoofdstuk 4** is dan ook een transgene SCA3 muismodel onderzocht. Dit muismodel is reeds in 2001 gegenereerd en bevat het volledige humane *ATXN3* gen met 84 CAG herhalingen. Om het moleculaire ziekteproces van dit muismodel in kaart te brengen, hebben we gebruik gemaakt van een multi-omic aanpak. Hiervoor zijn verschillende hersenregio's en bloedmonsters van de muizen geïsoleerd en onderzocht door middel van RNA sequencing. Met RNA sequencing kan worden vastgesteld welke genen anders tot expressie komen door toedoen van het mutante ataxine-3 eiwit. Uit deze analyses bleek dat het striatum en de hersenstam veel genexpressie veranderingen lieten zien in de transgene SCA3 muizen, terwijl in cortex en cerebellum relatief weinig expressie verschillen plaatsvonden. De betrokken genexpressie veranderingen wijzen op aangetaste CREB en α -adrenergische signaling pathways. Deze twee pathways hebben een belangrijke rol in het functioneren van neuronale cellen en zouden dus deels ten grondslag kunnen liggen aan het SCA3 ziekteproces. Deze signaling pathways waren echter niet sterk genoeg aangetast om te leiden tot motorische evenwichtsproblemen in de muizen.

De transgene SCA3 muis is in **hoofdstuk 5** gebruikt voor het testen van een AON gebaseerde therapie waarmee de toxische polyQ regio uit het ataxine-3 eiwit wordt verwijderd. Hiervoor werden een viertal AONs ontworpen om exon 10 van het *ATXN3* gen te skippen. Door het skippen van dit exon wordt de toxische polyQ regio uit ataxine-3 verwijderd, echter zorgt het ook voor een frameshift waardoor een stopcodon wordt geïntroduceerd. Het ataxine-3 eiwit dat uit dit gemodificeerde transcript wordt gevormd (ataxine-3 Δ C-terminus) is dus verkort en bevat geen polyQ regio meer. Ataxine-3 Δ C-terminus zal dan ook naar verwachting niet toxisch zijn voor cellen. De meest efficiënte AON (10.4) werd herhaaldelijk in het laterale hersenventrikel van de SCA3 muizen geïnjecteerd. Uit analyse van het hersenweefsel van de muizen behandeld met AON 10.4 bleek dat de AON aanwezig was in alle hersenregio's. Ook

het behandelingseffect, zijnde vorming van het ataxine-3 Δ C-terminus eiwit, werd aangetroffen in alle geteste hersenregio's. Behandeling met AON 10.4 resulteerde in verminderde hoeveelheid onoplosbaar ataxine-3, alsmede verminderde ataxine-3 lokalisatie in de celkern. Aangezien beide processen kenmerken zijn van ataxine-3 toxiciteit, lijkt exon 10 skippen een veelbelovende behandeling voor SCA3 te zijn.

AONs kunnen gemaakt worden met verschillende chemische modificaties. Uit verschillende pilot experimenten in ons lab is gebleken dat 2'Ome gemodificeerde AONs minder goed worden verdragen in de muizenhersen dan MOE gemodificeerde AONs (zoals gebruikt in hoofdstuk 5). Om deze reden hebben we in **hoofdstuk 6** door middel van een RNA sequencing aanpak onderzocht welke processen ten grondslag liggen aan de bijwerkingen van 2'Ome AONs in muizenhersen. In de hersenen van muizen behandeld met de 2'Ome AON was een duidelijke verhoogde expressie van immuunsysteemgenen waar te nemen, met name in het striatum. Daarnaast bleken de twee celtypen die belangrijk zijn voor een immuunreactie in de hersenen, microglia en astrocyten, geactiveerd te zijn in reactie op aanwezigheid van de AON. Uit deze studie valt dan ook te concluderen dat 2'Ome AONs leiden tot activatie van het immuunsysteem in muizenhersen, wat wellicht een deel van de bijwerkingen verklaart.

In dit proefschrift hebben we aangetoond dat AONs veelbelovende eigenschappen hebben voor mogelijke behandeling van SCA3. In **hoofdstuk 7** worden de resultaten uit dit proefschrift besproken en gerelateerd aan de huidige kennis m.b.t. AON onderzoek en klinische trials. In dit proefschrift wordt beschreven dat exon skippen van het CAG-bevattende exon in ataxine-3 haalbaar is in hersencellen van een muis. Echter hebben andere onderzoeksgroepen gedemonstreerd dat het downreguleren van ataxine-3 met AONs eveneens mogelijk is. In tegenstelling tot exon skippen zorgt downregulatie ervoor dat het ataxine-3 eiwit in het geheel niet gevormd wordt. Het voordeel van exon skippen is dat de ataxine-3 eiwitfunctie behouden blijft, terwijl het voordeel van de downregulatie is dat er lagere concentraties AON nodig lijken te zijn voor een efficiënt therapeutisch effect. Er wordt momenteel ook onderzoek gedaan naar andere genetische therapieën voor SCA3, zoals bijvoorbeeld ataxine-3 downregulatie door middel van viraal toegediende microRNAs. Ook lijkt CRISPR/Cas gemedieerde knockout een veelbelovend toekomstperspectief te hebben voor SCA3 behandeling. Het voordeel van dit soort viraal toegediende behandelingen is dat deze slechts eenmalig, of in ieder geval erg infrequent, geïnjecteerd moeten worden. AON gemedieerde behandelingsstrategieën hebben echter het voordeel dat distributie via intrathecale injectie in de hersenen erg goed is. Daarnaast wordt erg veel onderzoek gedaan naar chemische modificaties van AONs, welke de farmacokinetische en -dynamische eigenschappen aanzienlijk verbeteren. In de klinische trials voor spinale musculaire atrofie blijken AONs goed verdragen te worden in het centrale zenuwstelsel van mensen en de uitermate hoopgevende resultaten hebben dan ook geleid tot goedkeuring van het medicijn (Spinraza) in Amerika en Europa. Deze resultaten duiden dus op een goed perspectief voor toepassing van AONs in andere neurodegeneratieve aandoeningen zoals SCA3.