



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Preparing for CADASIL therapy

Gravesteijn, G.

Citation

Gravesteijn, G. (2020, October 28). *Preparing for CADASIL therapy*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/137984>

Version: 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/1887/137984>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/137984> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Gravesteijn, G.

Title: Preparing for CADASIL therapy

Issue Date: 2020-10-28

Appendices

Nederlandse samenvatting

List of abbreviations

List of co-author affiliations

List of publications

Portfolio

Curriculum Vitae

Dankwoord

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Introductie

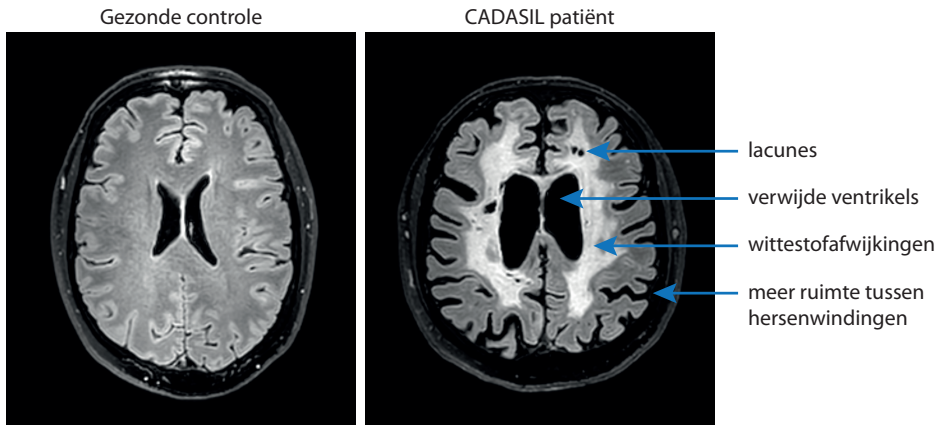
CADASIL is een erfelijke ziekte van de kleine bloedvaten in de hersenen, en gaat gepaard met (meerdere) beroertes, cognitieve achteruitgang en vroegtijdige dementie. Kinderen van patiënten met CADASIL hebben 50% kans om de ziekte-veroorzakende mutatie in het NOTCH3 gen te erven. In Nederland zijn er ongeveer 275 families bekend met CADASIL. Er is geen therapie beschikbaar die het CADASIL ziekteproces kan vertragen of voorkomen.

Het doel van het promotieonderzoek beschreven in deze thesis was om de therapieontwikkeling voor CADASIL te bevorderen, en zo stappen te zetten richting toekomstige klinische studies in patiënten. Dit hoofdstuk bevat een samenvatting van de achtergrond en de resultaten van het onderzoek beschreven in dit proefschrift.

CADASIL: het klinisch beeld

CADASIL patiënten krijgen hun eerste beroerte (herseninfarct) vaak tussen het 45^e en 60^e levensjaar. Sommige patiënten krijgen hun eerste beroerte echter eerder of later. Het eerste teken van de cognitieve achteruitgang is vaak een verminderde executieve functie (waardoor o.a. planning, redeneren, en het probleemoplossend vermogen achteruit gaan), en dat is soms al aanwezig voor de eerste beroerte. Uiteindelijk ontwikkelen veel CADASIL patiënten dementie. Een deel van de CADASIL patiënten heeft ook migraine en psychiatrische stoornissen, zoals een depressie.

De afwijkingen in het brein als gevolg van het ziekteproces kunnen zichtbaar gemaakt worden met een MRI hersenscan (Figuur 7.1). Op de hersenscan van patiënten zijn al vanaf het 20^e tot 30^e levensjaar witte stofafwijkingen te zien, die toenemen met de leeftijd. De herseninfarcten zijn zichtbaar op de hersenscan als uitsparingen in het breinweefsel, en worden lacunes genoemd. Verdere tekenen op de hersenscan zijn brein atrofie (minder hersenweefsel) en microbloedingen.



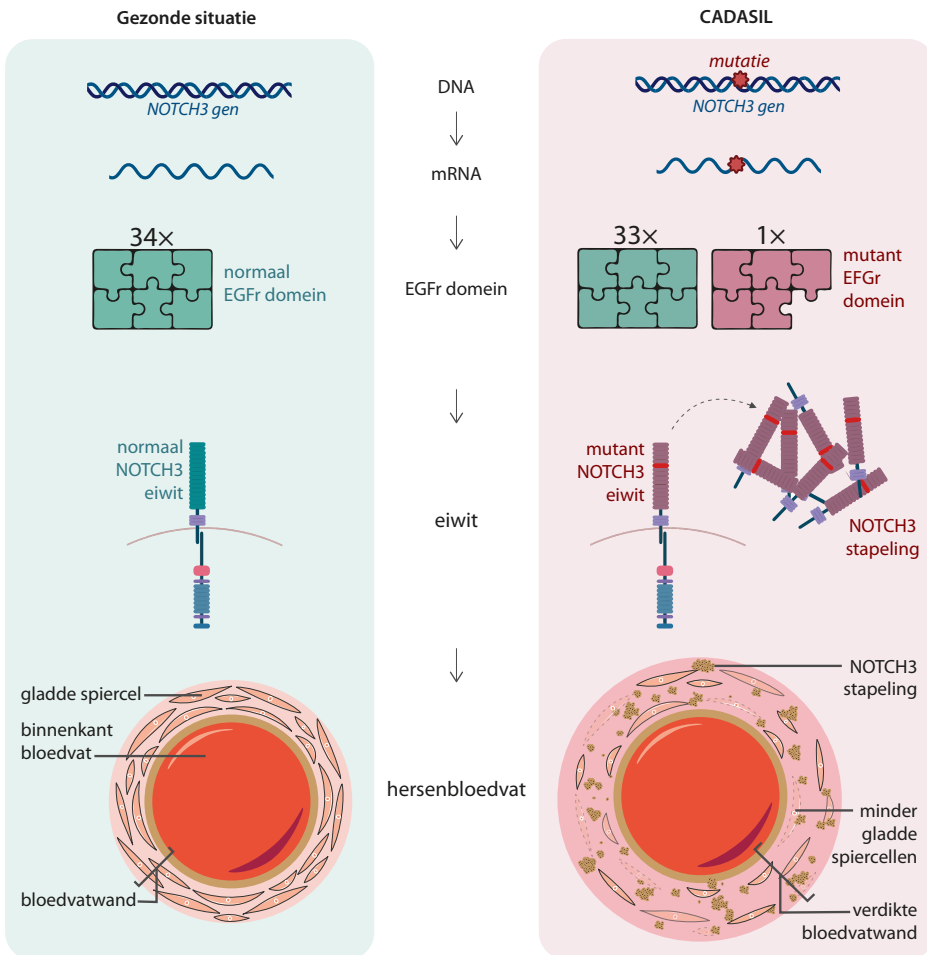
Figuur 7.1: MRI hersenscan van een gezond persoon en een CADASIL patiënt

Het brein van een patiënt met CADASIL laat veel wittestofafwijkingen zien. In de afwijkende witte stof zijn ook lacunes te zien: dit zijn gaten in het brein als gevolg van de herseninfarcten. Door de breinschade is er ook sprake van verkleining van het brein, dat te zien is door de verwijding van de ventrikels en de toegenomen ruimte tussen de hersenwindingen.

CADASIL: een erfelijke ziekte

CADASIL wordt veroorzaakt door een verandering in het DNA (mutatie) van het *NOTCH3* gen. Het *NOTCH3* gen bevat het recept voor het NOTCH3 eiwit, dat wordt gevormd via een kopie genaamd mRNA (Figuur 7.2, links). Het NOTCH3 eiwit is nodig voor de goede aanleg en functie van bloedvaten. Het NOTCH3 eiwit bevat 34 gelijkwaardige EGFr domeinen. Ieder EGFr domein bevat altijd 6 cysteine aminozuren. Die passen als puzzelstukjes in elkaar, en helpen bij de vorming van de juiste structuur van het eiwit.

NOTCH3 mutaties die bij CADASIL patiënten worden gevonden veranderen altijd het aantal cysteine aminozuren in één van de 34 EGFr domeinen, zodat er niet 6 cysteine aminozuren, maar 5 of 7 cysteine aminozuren aanwezig zijn (Figuur 7.2, rechts). Daardoor is de structuur van één EGFr domein en dus van het NOTCH3 eiwit incorrect, waardoor het mutante NOTCH3 eiwit gaat stapelen. Deze NOTCH3 stapeling vindt plaats in de wanden van de kleine slagaders door het hele lichaam, maar vooral in de hersenvaten. De NOTCH3 stapeling is te zien vlakbij de gladde spiercellen die het NOTCH3 eiwit aanmaken. In de NOTCH3 stapeling worden ook andere eiwitten weggevangen, waardoor die eiwitten hun functie niet meer kunnen uitvoeren. Als gevolg van dit hele proces verdikken de bloedvaatwanden van de kleine hersenslagaders en wordt de doorbloeding naar de hersenen minder. Door onvoldoende bloedtoevoer ontstaat de schade aan het brein die te zien is op de hersenscan. Waarom de NOTCH3 stapeling alleen in het brein tot symptomen leidt is niet bekend.



Figuur 7.2: Het ziektemechanisme van CADASIL

Het *NOTCH3* gen (DNA) wordt via een kopie (mRNA) vertaald naar een *NOTCH3* eiwit. Het *NOTCH3* eiwit heeft normaal gesproken 34 gelijkwaardige EGFr domeinen. Ieder EGFr domein bevat 6 cysteïne aminozuren, die als puzzelstukjes in elkaar passen. Bij CADASIL bevat het *NOTCH3* gen een mutatie, waardoor een EGFr domein niet zes, maar vijf of zeven cysteïne aminozuren heeft. Daardoor gaat *NOTCH3* eiwit stapelen. Hierdoor treedt er verdikking van de bloedvatwand op en dit heeft een negatief effect op de functie van de kleine hersenbloedvaten.

CADASIL: ziektemodellen

Ziektemodellen zijn nodig om therapieën voor CADASIL op te testen, voordat dat in patiënten kan. De Leidse onderzoeksgroep heeft een muismodel ontwikkeld met het menselijke *NOTCH3* gen dat een CADASIL mutatie bevat. Vanaf een leeftijd van 6 weken lieten deze muizen *NOTCH3* stapeling in de bloedvaatwanden in het brein zien. Met elektronenmicroscopie laten de muizen vanaf de leeftijd van 6 maanden ook GOM deposities zien, wat een andere uiting is van de *NOTCH3* stapeling.

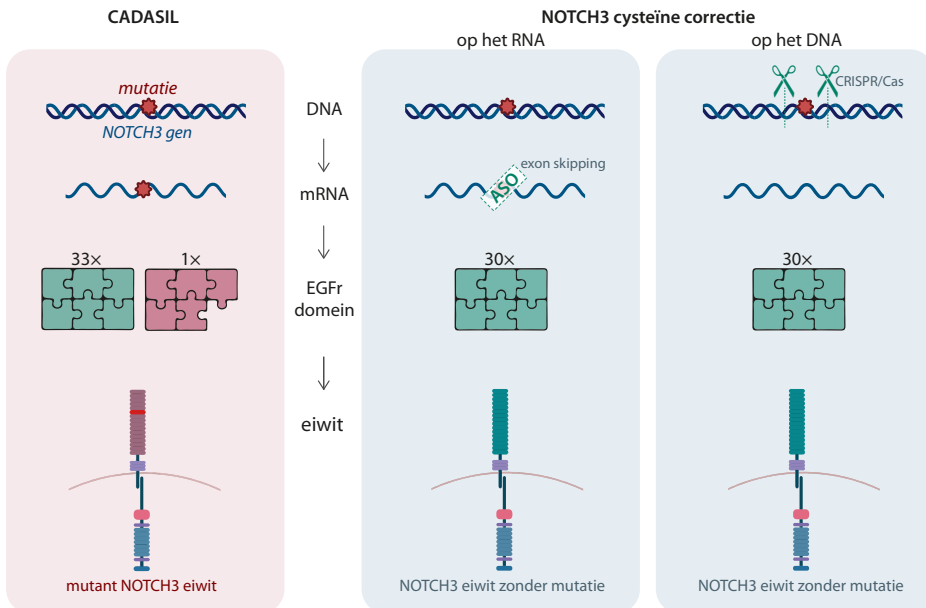
Hoofdstuk 2 bevat een beschrijving van hoe GOM deposities zich ontwikkelen. Naarmate de CADASIL muizen ouder werden hadden zij méér en grotere GOM deposities. In het brein van overleden CADASIL patiënten kwamen GOM deposities nóg veel vaker voor, en waren ze veel groter. Op basis van deze observaties hebben wij vijf GOM stadia bepaald waarin GOM deposities kunnen worden ingedeeld. Deze indeling helpt om de ernst van de GOM deposities te meten, en kan mogelijk gebruikt worden als maat voor de ernst van het CADASIL ziekteproces.

In hoofdstuk 2 wordt ook beschreven dat de hersenbloedvaten van de CADASIL muizen niet verdikt zijn en dat zij normale hoeveelheden gladde spiercellen hebben. Ook vonden wij geen afwijkingen in de witte stof van het brein, de bloedtoevoer naar het brein, en in het geheugen van de CADASIL muizen. De Leidse CADASIL muizen laten dus de vroege fase van de ziekte zien, maar geen andere kenmerken. Deze vroege fase kan worden gemonitord door de hoeveelheid *NOTCH3* stapeling te meten of verschillende stadia van GOM deposities te meten. Andere ziektemodellen, waarbij bijvoorbeeld bloedvaten in het lab worden nagemaakt, kunnen een nuttige aanvulling zijn op de CADASIL muismodellen.

Therapie-ontwikkeling: *NOTCH3* cysteïne correctie

Aangezien de *NOTCH3* stapeling een belangrijke rol speelt in het ziekteproces, ontwikkelen verschillende laboratoria therapieën die *NOTCH3* stapeling tegengaan. Het beste moment om deze therapieën te starten zal waarschijnlijk zijn voordat patiënten onomkeerbare breinschade hebben. De strategie van de Leidse onderzoeksgroep richt zich op het corrigeren van het foutief aantal cysteïne aminozuren per EGFr domein. Deze aanpak heet *NOTCH3* cysteïne correctie (Figuur 7.3).

CADASIL mutaties zijn op RNA niveau 'af te plakken' met een moleculaire pleister (genaamd ASO), zodat er geen mutant *NOTCH3* eiwit ontstaat, maar een *NOTCH3* eiwit zonder mutatie. ASOs worden ook bij andere erfelijke ziekten als moleculaire pleister gebruikt. Door de moleculaire pleisters wordt een deel van het RNA onzichtbaar gemaakt en daardoor overgeslagen als het mRNA wordt gevormd. Vanuit het mRNA wordt het eiwit gemaakt dat de mutatie dan niet meer bevat. Deze techniek wordt 'exon skipping' genoemd.



Figuur 7.3: NOTCH3 cysteine correctie als mogelijke therapie voor CADASIL

Bij NOTCH3 cysteine correctie wordt de mutatie uit het RNA of uit het DNA gehaald. Bij exon skipping wordt met een moleculaire pleister (ASO) als het ware over de mutatie heen geplakt op het RNA. Bij CRISPR/Cas wordt met een moleculaire schaar het stukje DNA met de mutatie uit het gen geknipt. In beide gevallen ontstaat een iets korter, maar functioneel NOTCH3 eiwit waar de mutatie niet meer in zit.

Eerdere studies van de Leidse onderzoeksgroep toonden aan dat NOTCH3 exon skipping technisch mogelijk is in kweken van cellen in het lab. Het was niet mogelijk om het effect op NOTCH3 stapeling te bestuderen, omdat NOTCH3 stapeling niet goed na te bootsen is in celkweken.

Hoofdstuk 3 beschrijft een familie met een bijzondere NOTCH3 mutatie die enerzijds een 'gewone' CADASIL mutatie lijkt te zijn; maar anderzijds ook uit zichzelf werkt als een moleculaire pleister. Deze bijzondere mutatie 'behandelt' zichzelf dus op een zelfde manier als NOTCH3 cysteine correctie dat doet. De familie met deze mutatie is uitgebreid onderzocht om de effecten van cysteine correctie op de NOTCH3 stapeling in mensen te bepalen. Familieleden met deze mutatie hadden geen GOM deposities en zeer weinig NOTCH3 stapeling in vergelijking tot andere CADASIL patiënten. Wel hadden zij iets meer NOTCH3 stapeling dan gezonde personen. Dit kan worden verklaard doordat de mutatie waarschijnlijk niet als perfecte moleculaire pleister werkt, waardoor er nog een kleine beetje mutant NOTCH3 eiwit wordt gevormd dat wel gaat stapelen. De familieleden hadden een relatief mild CADASIL ziektebeeld.

Op basis van deze resultaten concluderen we in hoofdstuk 3 dat NOTCH3 cysteine correctie leidt tot een vermindering van de NOTCH3 stapeling, en mogelijk ook tot een milder ziektebeloop met een latere beginleeftijd van de klachten. Deze bevindingen zijn bemoedigend voor een verdere ontwikkeling van NOTCH3 cysteine correctie als therapeutische strategie voor CADASIL.

Voor de verdere ontwikkeling van de NOTCH3 cysteine correctie therapie, zijn binnen dit promotietraject ASOs toegediend aan CADASIL muizen om te testen of NOTCH3 exon skipping werkt in muizen, en om te testen of dit de NOTCH3 stapeling afremt. Er was wel sprake van exon skipping, maar dit was zo weinig dat het effect op de NOTCH3 stapeling niet te meten was. Een verklaring hiervoor kan zijn dat de ASOs niet goed genoeg zijn, of dat zij onvoldoende worden afgeleverd in de wanden van de hersenbloedvaten. Betere ASOs kunnen worden ontwikkeld door biotechnologie bedrijven, die grote hoeveelheden ASOs tegelijk kunnen testen om te kijken welke ASO de het beste werkt én op de goede plek in het lichaam wordt afgeleverd.

Een alternatief voor NOTCH3 cysteine correctie op het RNA (met exon skipping) is om de correctie op het DNA uit te voeren met een moleculaire schaar (CRISPR/Cas). In hoofdstuk 3 wordt beschreven dat dit in het lab technisch mogelijk is in celkweken. CRISPR/Cas is een relatief nieuwe methode en wordt ook bij andere erfelijke ziektes als mogelijke therapie getest. Het voordeel van NOTCH3 cysteine correctie met CRISPR/Cas is dat het exon met de mutatie permanent uit het DNA wordt geknipt. Er zijn echter nog vele nadelen: de bezorging van CRISPR/Cas9 naar de gladde spiercellen in de bloedvaatwanden zal een enorme uitdaging zijn. Daarnaast kan deze methode blijvende, niet-bedoelde veranderingen veroorzaken op het DNA, dat mogelijk veel bijwerkingen kan geven.

Variatie in het CADASIL ziektebeloop

Voor toekomstige therapeutische klinische studies in patiënten moet het ziektebeloop duidelijk zijn en ook welke variatie in ziektebeloop er is tussen patiënten. In eerdere wetenschappelijke studies werden CADASIL patiënten onderzocht met een tussenpoos van 2, 3 of 7 jaar. In hoofdstuk 4 wordt een studie beschreven waarin CADASIL patiënten na 18 jaar opnieuw werden onderzocht. Het merendeel van de patiënten ging achteruit gedurende deze periode, maar een klein deel (ongeveer een vijfde) van de patiënten bleef opvallend stabiel. Een paar patiënten bleven vrij van beroerte tot (boven) het 60^e levensjaar. Tevens bleek uit onze studie dat het hebben van (veel) lacunes een voorspeller is voor snellere achteruitgang. Welke andere factoren het ziektebeloop bepalen is slechts deels bekend. Patiënten met een mutatie in EGF α domein 1 tot en met 6 hebben gemiddeld genomen een ernstiger ziektebeloop. Ook roken en hoge bloeddruk geven een ernstiger beloop. De ontdekking van andere erfelijke en niet-erfelijke factoren kunnen wellicht helpen in het voorspellen van het ziektebeloop.

Ziekte-ernst meten

Als een therapie kan worden getest in CADASIL patiënten, moet ook gemeten kunnen worden of de therapie werkzaam is. Hiervoor zijn 'uitleesmaten' nodig. Gebeurtenissen zoals een beroerte en het ontstaan van een handicap of dementie kan hiervoor gebruikt worden. Ook cognitieve testen zouden gebruikt kunnen worden als uitleesmaat. Het nadeel van deze uitleesmaten is dat studies dan lang moeten duren om een effect van de therapie te kunnen meten, terwijl klinische studies normaliter niet langer dan 1 of 2 jaar duren. Een alternatief is het gebruik van surrogaat uitleesmaten. Surrogaat uitleesmaten (ookwel surrogaat markers of biomarkers) moeten meetbaar zijn, moeten geassocieerd zijn met het ziektebeloop, en moeten in een kort tijdsbestek veranderingen in ziekte-ernst kunnen oppikken.

Metingen op MRI hersenscans kunnen gebruikt worden als surrogaat markers. Het aantal lacunes en de hoeveelheid brein atrofie zijn sterk gerelateerd aan de klinische en cognitieve achteruitgang. De hoeveelheid witte stofafwijkingen is in veel mindere mate gerelateerd aan cognitieve achteruitgang. De bloedtoevoer naar het brein werd in eerdere studies genoemd als mogelijke biomarker, maar de bevindingen beschreven in hoofdstuk 4 onderschrijven dat niet. Een nadeel van gebruik van biomarkers die kunnen worden gemeten met een hersenscan, is dat hersenscans relatief duur en tijdrovend zijn.

Biomarkers in het bloed zouden hiervoor een oplossing kunnen zijn, aangezien bloedprikken relatief gemakkelijk is en vaker gedaan kan worden. In hoofdstuk 5 wordt beschreven dat Neurofilament Light-chain (NfL) in het bloed een goede biomarker is. De hoeveelheid NfL in het bloed is gerelateerd aan de hoeveelheid hersenschade (lacunes en brein atrofie) en aan de cognitieve achteruitgang. Daarnaast hebben patiënten met meer NfL in het bloed een ernstiger ziektebeloop en komen zij sneller te overlijden. NfL zou in de toekomst in klinische studies gebruikt kunnen worden als surrogaat marker, en dan met name bij patiënten die al symptomen hebben.

Stand van zaken

Er is veel onderzoek dat nog gedaan moet worden voordat NOTCH3 cysteine correctie getest kan worden bij CADASIL patiënten. NOTCH3 cysteine correctie, of een therapie die door andere labs wordt ontwikkeld, moet eerst voldoende effectief blijken in CADASIL ziektemodellen. Daarnaast moeten biomarkers ontwikkeld, getest en gevalideerd worden, zodat de ziekte-ernst en het effect van een therapie gemeten kan worden. Tevens blijft verder onderzoek nodig naar ziektemechanismen en beschermende factoren, omdat die ook kunnen bijdragen aan de ontwikkeling van andere mogelijke therapieën. Deze onderzoeken zijn gaande: zeker vier labs wereldwijd richten zich op de ontwikkeling van een therapie voor CADASIL. Ook worden grote groepen CADASIL patiënten momenteel vervolgd, inclusief patiënten met een relatief mild beeld, om nieuwe biomarkers te identificeren en het beloop van de ziekte te kunnen voorspellen.

Hoewel er nog veel onderzoek gedaan moet worden, is in afgelopen 25 jaar de aandacht voor en het onderzoek naar CADASIL enorm toegenomen. Er is veel progressie geboekt sinds de ontdekking van *NOTCH3* mutaties als oorzaak voor CADASIL: er is meer duidelijk over het ziekteproces, er zijn meerdere ziektemodellen ontwikkeld, en er zijn verschillende uitleesmaten voor de ziekte-ernst beschreven. Hoewel wetenschappelijk onderzoek in kleine stappen voortschrijdt, levert iedere stap een belangrijke bijdrage. Het onderzoek beschreven in dit proefschrift draagt bij aan het grote doel: het voorbereiden van een therapie voor CADASIL patiënten.