



Universiteit
Leiden
The Netherlands

NOTCH3 cysteine correction : developing a rational therapeutic approach for CADASIL

Rutten, J.W.

Citation

Rutten, J. W. (2016, September 20). *NOTCH3 cysteine correction : developing a rational therapeutic approach for CADASIL*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/43112>

Version: Not Applicable (or Unknown)

License:

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/43112>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/43112> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Rutten, J.W.

Title: NOTCH3 cysteine correction : developing a rational therapeutic approach for CADASIL

Issue Date: 2016-09-20

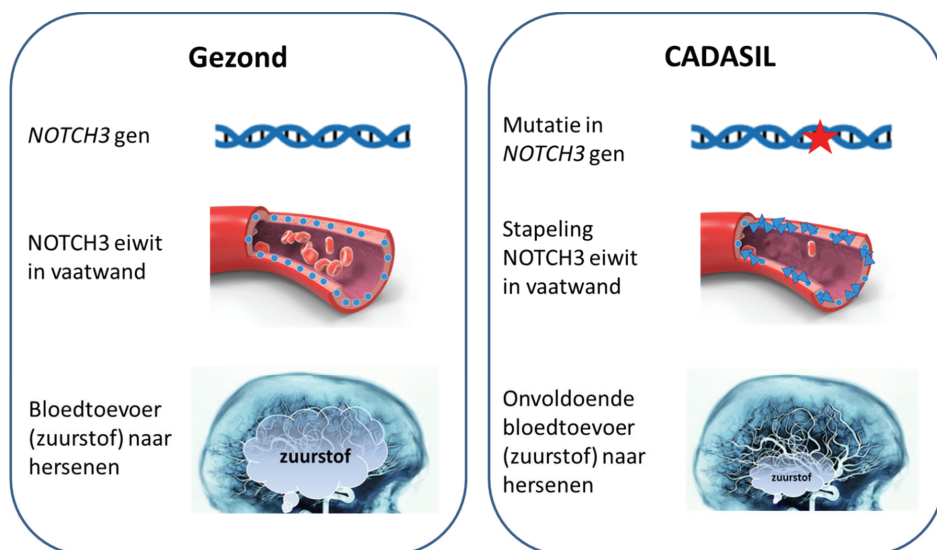
A large, light gray, stylized number 8 logo is centered on the page. It is composed of two concentric circles, with the top circle slightly offset to the right relative to the bottom circle.

NEDERLANDSE SAMENVATTING

CADASIL is een erfelijke ziekte van de kleine hersenvaten, die leidt tot beroertes en cognitieve achteruitgang vanaf een gemiddelde leeftijd van 50 jaar. De ziekte erft autosomaal dominant over: dit betekent dat elk kind van een ouder met CADASIL 50% kans heeft om de ziekte te erven. Er is op dit moment geen medicijn dat het ziekteproces bij CADASIL kan vertragen. Het overkoepelende doel van de studies beschreven in dit proefschrift is het zetten van de eerste stappen richting een therapie voor CADASIL patiënten.

Hoofdstuk 1 bevat een algemene introductie over de ziekte CADASIL en beschrijft verschillende aspecten die van belang zijn bij het ontwikkelen van een therapie. De oorzaak van CADASIL is een verandering (mutatie) in een specifiek deel van de erfelijke code: het *NOTCH3* gen. Dit gen bevat de code voor het NOTCH3 eiwit, wat van belang is voor een goede aanleg en functie van bloedvaten. CADASIL patiënten hebben een mutatie in het *NOTCH3* gen, waardoor het NOTCH3 eiwit niet goed vouwt en gaat stapelen in de vaatwand. Dit zorgt voor een verstoorde bloedtoevoer naar de hersenen, met beroertes en dementie tot gevolg (Figuur 1).

In het LUMC wordt gewerkt aan een mogelijke therapie voor CADASIL, genaamd 'cysteïne correctie'. Het doel van cysteïne correctie is de verkeerde vouwing van het NOTCH3 eiwit te voorkomen, om zo de schadelijke eiwitstapeling in de hersenvaten tegen te gaan en het ontstaan van beroertes en dementie uit te stellen.



Figuur 1. De oorzaak van CADASIL is een mutatie in het *NOTCH3* gen. Deze mutatie zorgt voor verkeerde vouwing en stapeling van het NOTCH3 eiwit in de vaatwand. Dit leidt tot een verstoorde bloedtoevoer naar de hersenen, waardoor de hersenen te weinig zuurstof krijgen.

Om te kunnen onderzoeken of cysteine correctie in de toekomst als therapie voor CADASIL zou kunnen worden gebruikt, moeten velen stappen worden gezet in het wetenschappelijk onderzoek. Zo moet er voldoende kennis zijn over de mutaties die de ziekte veroorzaken en hoe deze mutaties tot de ziekte leiden. Daarnaast moet cysteine correctie uitgebreid getest worden in cel- en muismodellen, en zijn uitleesmaten nodig om de effectiviteit van het medicijn te kunnen meten. Tot slot moet de variabiliteit in het natuurlijk beloop van de ziekte bekend zijn, alsmede welke factoren van invloed zijn op het ziektebeloop. De hoofdstukken van dit proefschrift gaan over deze verschillende aspecten die van belang zijn voor het begrijpen van de ziekte en de ontwikkeling van een therapie.

Hoofdstuk 2 beschrijft welke onderzoeken belangrijk zijn voor het stellen van de diagnose CADASIL. Hierbij ligt de nadruk op de genetische diagnose: welk type mutaties in *NOTCH3* veroorzaakt CADASIL, en welke veranderingen in *NOTCH3* leiden niet tot ziekte. Er zijn inmiddels meer dan 200 *NOTCH3* mutaties bekend die CADASIL kunnen veroorzaken. Al deze mutaties hebben één belangrijke overeenkomst: ze zorgen voor een cysteine aminozuurverandering in het *NOTCH3* eiwit. Elk eiwit in het lichaam is opgebouwd uit aminozuren. Cysteine is één van deze aminozuren, en is belangrijk voor een normale vouwing van het eiwit. Wanneer het aantal cysteines in het *NOTCH3* eiwit verandert, veroorzaakt dit een verkeerde vouwing en schadelijke stapeling van het eiwit in de vaatwand.

Het vinden van een cysteine- veranderende mutatie in het *NOTCH3* gen bij een patiënt bevestigt de diagnose CADASIL. Er zijn in de literatuur ook een aantal patiënten beschreven met een mutatie in het *NOTCH3* gen die niet tot een cysteine-aminozuurverandering leidt. Deze niet-cysteine veranderende mutaties worden echter ook vaak gevonden in gezonde personen. Er is discussie over de vraag of deze niet- cysteine veranderende mutaties ook tot CADASIL kunnen leiden.

Wanneer een niet-cysteine veranderende mutatie wordt gevonden in een patiënt, is er aanvullend onderzoek nodig om te bepalen of er wel of niet sprake is van CADASIL. De medische voorgeschiedenis van de patiënt moet goed in kaart gebracht worden, alsmede de familiegeschiedenis. Een her-beoordeling van de MRI scan door een in CADASIL gespecialiseerd radioloog en het afnemen van een huidbiopt geven vaak belangrijke informatie. In het huidbiopt wordt gekeken of er sprake is van *NOTCH3* eiwitstapeling. Wanneer de uitkomsten van al deze onderzoeken passen bij CADASIL, dan moet met aanvullende technieken gekeken worden of er kleine stukken van het *NOTCH3* gen ontbreken (deletie) of juist dubbel aanwezig zijn (duplicatie). In zeldzame gevallen kunnen dergelijke deleties en duplicaties namelijk ook CADASIL veroorzaken. De conclusie van hoofdstuk 2 is dat er tot op heden er geen overtuigend bewijs is dat niet-cysteine veranderende mutaties CADASIL

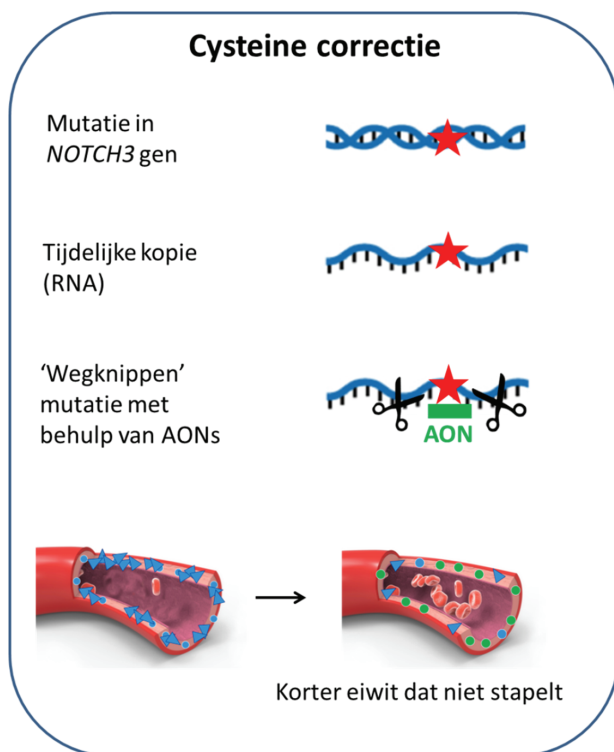
kunnen veroorzaken. Wanneer een dergelijke mutatie wordt gevonden, is er altijd aanvullend onderzoek nodig voordat de diagnose kan worden gesteld.

Hoofdstuk 3 beschrijft de identificatie van een aantal personen met een speciaal type *NOTCH3* mutatie, namelijk een zogenoemde hypomorfe mutatie. Deze mutaties leiden niet tot een cysteine aminozuurverandering, maar zorgen ervoor dat er minder *NOTCH3* eiwit wordt aangemaakt. Hoofdstuk 3 toont aan dat dergelijke hypomorfe mutaties geen CADASIL veroorzaken, en ook niet tot duidelijke andere symptomen leiden. Deze bevinding is van belang voor het correct interpreteren van *NOTCH3* mutaties, en geeft daarnaast belangrijke inzichten in het ontstaan van CADASIL en mogelijkheden voor therapieën. De personen met een hypomorfe *NOTCH3* mutatie zijn gezond, hetgeen suggereert dat een lagere hoeveelheid *NOTCH3* eiwit al voldoende is voor normaal functioneren. Een mogelijk aangrijpingspunt voor therapie, naast cysteine correctie, zou daarom *NOTCH3* downregulatie kunnen zijn. Hierbij wordt de totale productie van het *NOTCH3* eiwit verminderd, waardoor in theorie de schadelijke *NOTCH3* eiwitstapeling ook minder zal zijn.

In **hoofdstuk 4** wordt de rationale achter de genetische interventie cysteine correctie beschreven en wordt getest of cysteine correctie werkt in cellen van CADASIL patiënten. Het idee voor cysteine correctie is voortgekomen uit het gegeven dat *NOTCH3* mutaties bij CADASIL patiënten altijd leiden tot een verandering in het aantal cysteines in het *NOTCH3* eiwit. Met cysteine correctie wordt geprobeerd dit aantal cysteines te herstellen, om zo de schadelijke *NOTCH3* eiwitstapeling tegen te gaan. Cysteine correctie kan worden bereikt met behulp van antisense oligonucleotiden (AONs). AONs binden aan het RNA, dit is een tijdelijke kopie van het DNA die nodig is om eiwitten te kunnen produceren. Door aan het RNA te binden kunnen de AONs ervoor zorgen dat de mutatie uit het RNA geknipt wordt (Figuur 2). Hierdoor wordt een korter *NOTCH3* eiwit aangemaakt, met het correcte aantal cysteines. Software programma's die de vouwing van het *NOTCH3* eiwit kunnen voorspellen laten zien dat dit kortere eiwit een normale vouwing zou moeten hebben. In theorie zou dit herstellende *NOTCH3* eiwit dus niet gaan stapelen in de vaatwand. De experimenten beschreven in hoofdstuk 4 tonen aan dat *NOTCH3* cysteine correctie technisch mogelijk is in cellen van CADASIL patiënten. Daarnaast wordt aangetoond dat het herstellende *NOTCH3* eiwit dat gevormd wordt zijn normale functie in de cellen behoudt.

Om cysteine correctie verder te kunnen ontwikkelen is een relevant muismodel nodig. Het genereren en karakteriseren van een dergelijk muismodel is beschreven in **hoofdstuk 5**. Dit CADASIL muismodel is gemaakt door het menselijke *NOTCH3* gen in een bevruchte eicel van een muis te injecteren. Hierdoor wordt het menselijke gen in de erfelijke code van de muis ingebouwd, en maakt de muis niet alleen

het muizen-Notch3 eiwit aan, maar ook het menselijke NOTCH3 eiwit. Omdat het menselijke *NOTCH3* gen permanent is ingebouwd in de erfelijke code van de muis, wordt het ook doorgegeven aan de volgende generatie: hierbij spreken we van een muizenlijn. Met deze techniek zijn in totaal 5 verschillende muizenlijnen gemaakt: 1 lijn die een normaal menselijk *NOTCH3* gen bevat en 4 lijnen die het menselijke *NOTCH3* gen met een mutatie bevatten. De muizen die het *NOTCH3* gen met een mutatie hebben krijgen dezelfde NOTCH3 eiwitstapeling als ook bij CADASIL patiënten wordt gezien. De NOTCH3 stapeling is hoger naarmate er meer mutant NOTCH3 eiwit wordt aangemaakt, en neemt duidelijk toe met de leeftijd. Om de NOTCH3 stapeling te kunnen kwantificeren is de 'NOTCH3 score' ontwikkeld: een maat voor de hoeveelheid NOTCH3 stapeling in de hersenvaten. Omdat het nieuwe CADASIL muismodel het menselijke *NOTCH3* gen bevat en al op jonge leeftijd NOTCH3 eiwitstapeling laat zien, is het een goed model voor het testen van mogelijke therapieën voor CADASIL, zoals bijvoorbeeld cysteine correctie. Hierbij kan NOTCH3 score kan worden gebruikt als een uitleesmaat om het effect van de therapie op NOTCH3 eiwitstapeling te meten.



Figuur 2. Cysteine correctie met behulp van AONs.

De tot op heden geschatte prevalentie van CADASIL is 2-5 per 100.000 personen. Echter, de ziekte wordt vaak niet herkend door artsen, hetgeen leidt tot onder-diagnostiek. CADASIL komt dus waarschijnlijk veel vaker voor. **Hoofdstuk 6** laat zien dat de frequentie van CADASIL- veroorzakende mutaties 100-maal hoger ligt dan de tot nu toe geschatte prevalentie van de ziekte. Deze bevinding toont aan dat er waarschijnlijk veel meer CADASIL patiënten zijn dan gedacht, maar ook dat veel van deze patiënten waarschijnlijk een relatief mild beeld hebben. De meeste CADASIL patiënten die tot nu toe zijn gediagnostiseerd krijgen een eerste beroerte rond de leeftijd van 50 jaar. De leeftijd waarop de eerste symptomen zich manifesteren varieert echter sterk. **Hoofdstuk 6** laat zien dat er CADASIL patiënten zijn die tot de leeftijd van 70 jaar nauwelijks klachten hebben. Daarnaast toont hoofdstuk 6 aan dat de plek van de mutatie in het *NOTCH3* gen waarschijnlijk één van de factoren is die een rol speelt bij de variatie in de ernst van de ziekte.

Hoofdstuk 7 bevat een samenvatting van de verschillende studies beschreven in dit proefschrift, en bespreekt welk vervolgonderzoek nodig is om cysteine correctie verder te kunnen ontwikkelen als mogelijke toekomstige therapie voor CADASIL patiënten. Een belangrijke volgende stap die moet worden gezet is het aantonen dat cysteine correctie inderdaad *NOTCH3* stapeling vermindert. Dit kan deels worden onderzocht in speciale celmodellen die momenteel worden gemaakt, maar zal uiteindelijk moeten worden bepaald door experimenten in muizen. Hiervoor is het van belang dat er voldoende AON terecht komt op de juiste plek: de gladde spiercellen in de hersenvaten. Vervolgonderzoek zal moeten aantonen wat de beste toedieningsmethode is om voldoende AON in de hersenvaten te krijgen. Een andere belangrijke stap is het verder ontwikkelen van uitleesmaten. De *NOTCH3* score zoals beschreven in hoofdstuk 5 van dit proefschrift is een uitleesmaat voor *NOTCH3* stapeling in de muizen, maar kan potentieel ook worden gebruikt als uitleesmaat in mensen. Daarnaast zijn er mogelijk uitleesmaten in bloed.

In de toekomst zal het steeds gangbaarder worden om bij mensen de gehele erfelijke code te analyseren. Hiermee zal duidelijk worden hoeveel personen in de populatie een *NOTCH3* mutatie hebben die nu, deels vanwege een mild beeld, niet gediagnostiseerd worden. Het identificeren van meer personen met een *NOTCH3* mutatie is van belang om beter te begrijpen hoe variabel de ziekte CADASIL precies is, en welke factoren hierop van invloed zijn. Zo kunnen beschermende factoren worden geïdentificeerd, die als aangrijpingspunt kunnen dienen voor leefstijladviezen en nieuwe mogelijke therapieën voor CADASIL.

CURRICULUM VITAE

Julie Rutten is geboren op 1 augustus 1984 te Breda. Na 1 jaar Werktuigbouwkunde te hebben gestudeerd aan de TU Delft, begon zij in 2004 met de studie Geneeskunde aan het Leids Universitair Medisch Centrum (LUMC). Vanaf 2008 heeft zij dit gecombineerd met de studie Biomedische Wetenschappen, eveneens aan het LUMC. Een deel van haar opleiding volgde zij aan het Karolinska Institutet in Zweden en aan de Universidade de Coimbra in Portugal. In 2011 en 2012 behaalde Julie het artsexamen en het masterdiploma Biomedische Wetenschappen (cum laude), waarna zij startte met haar promotieonderzoek op de afdelingen Humane Genetica en Klinische Genetica aan het LUMC, onder supervisie van dr. Saskia Lesnik Oberstein, prof. Annemieke Aartsma-Rus en prof. Gert-Jan van Ommen. Binnen dit promotietraject heeft Julie gewerkt aan therapieontwikkeling voor de erfelijke ziekte CADASIL, waarbij zij zowel klinische als preklinische studies heeft verricht. Tijdens haar onderzoek is Julie een aantal maanden werkzaam geweest aan het Institute for Stroke and Dementia Research in München. De resultaten van haar promotieonderzoek zijn beschreven in dit proefschrift en gepresenteerd op meerdere (inter)nationale congressen. Voor deze presentaties ontving Julie in 2014 de Annual award van de Nederlandse Vereniging voor Humane Genetica en in 2015 de Young Investigator Award van The European Society of Human Genetics. Tijdens haar promotieonderzoek is Julie actief betrokken geweest bij het opzetten van de patiëntenvereniging Stichting Platform CADASIL. Tevens heeft zij via verschillende media uitleg gegeven over de ziekte en het onderzoek naar een mogelijke therapie. In 2016 is Julie gestart met de opleiding tot Klinisch Geneticus aan het LUMC, hetgeen zij zal combineren met het onderzoek naar therapieontwikkeling voor CADASIL.

