



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## **CRB1 gene therapy coming of age: mechanistic insight and rAAV assays on mouse & human retinal organoid models**

Buck, T.M.

### **Citation**

Buck, T. M. (2022, September 28). *CRB1 gene therapy coming of age: mechanistic insight and rAAV assays on mouse & human retinal organoid models*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3464695>

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/1887/3464695>

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

## Nederlandse Samenvatting

---

Wereldwijd lijdt 1 op de 4000 mensen aan een erfelijke netvliesziekte (ongeveer 4000-6000 Nederlandse patiënten). Erfelijke netvliesziekten ontstaan door afwijkingen in de genetische code (DNA) van genen, met gevolgen voor de functie en expressie van het eiwit. Genetische veranderingen op de twee *CRB1*-gen allelen kunnen retinitis pigmentosa (RP), Leber congenitale amaurose (LCA) of in sommige gevallen macula-degeneratie veroorzaken. *CRB1*-genvarianten op beide allelen komen voor in ongeveer 7-17% van alle gevallen van LCA (1 op de 250.000 mensen; 60-90 Nederlandse patiënten) en in 3-9% van alle gevallen van retinitis pigmentosa (1 op de 90.000 mensen; 130-390 Nederlandse patiënten). In *CRB1*-diermodellen of op oogscans van *CRB1*-patiënten is aangetoond dat (a) de lichtgevoelige fotoreceptoren degenereren (vooral in de retinale periferie), (b) de celadhesie kan verminderen tussen Müller gliacellen (MGCs) en fotoreceptoren (FR), FR-FR, en MGCs-MGCs, en (c) soms de celcyclus tijdens de ontwikkeling van het netvlies verstoord raakt. Het gevolg is vermindering van het zicht en uiteindelijk blindheid in deze patiëntengroep. Onderzoek heeft aangetoond dat het CRB1 eiwit in het neuronale netvlies een significante rol speelt bij apicale polariteitscomplexen – zoals de Crumbs en PAR eiwitcomplexen – in Müller gliacellen en fotoreceptoren bij het external limiting membrane (ELM). CRB1 kan door de polariteitscomplexen eiwit-adhesie-moleculen aansturen, actomyosine-cytoskeleteiwitten rekruteren en de ruimtelijk-temporele netvliesgenese reguleren via Notch/mTORC1/Hippo pathways.

Op dit moment zijn er geen behandelingen beschikbaar voor monogenetische neuronale netvliesziekten. Een veelbelovende therapievorm in ontwikkeling voor monogenetische ziekten is de genterapie. De ontwikkeling van genterapieën voor patiënten bestaat uit (a) het opstellen van relevante ziektemodellen, (b) het genereren en optimaliseren van transgenen en de vectorcassette, (c) het screenen van zorgvuldig geselecteerde virale capsiden, en (d) het testen van de genterapie in proof-of-concept studies (POCs). De veelbelovende kandidaten (genterapieën) moeten gescreend worden op hoe efficiënt ze de vector tot expressie kunnen brengen in de doelwitcellen, terwijl bijeffecten geminimaliseerd worden. Een voorbeeld van de werking van genterapie is hier beschreven voor Luxturna® (voretigene neparvovec-rzyl), een genterapie voor de biallelische *RPE65*-afgeleide erfelijke retinale pigmentepitheel (RPE) ziekte. Laatstgenoemde werd onlangs goedgekeurd door de EMA en FDA. Deze genterapie is gebaseerd op het verpakken van het cDNA van het *RPE65*-gen onder controle van een ubiquitaire promotor (CBA) in recombinant adeno-geassocieerd virus serotype 2 (rAAV2)-deeltjes. De rAAV-deeltjes worden in de subretinale ruimte geïnjecteerd waardoor RPE-cellen geïnfecteerd worden. De *RPE65*-cDNA in de rAAV-deeltjes worden in de geïnfecteerde cellen uitgepakt en getransporteerd naar de celkern waar het episomaal stabiele cirkelvormige DNA-structuren vormt. Uiteindelijk komt het *RPE65*-transgen tot expressie in de RPE-cellen waar het het gevonden RPE-fenotype

herstelt. Soortgelijke strategieën zijn in ontwikkeling (maar nog niet goedgekeurd) voor vele erfelijke retinale dystrofieën, waaronder *CRB1*-gerelateerde netvliesziektes (zie bijvoorbeeld **hoofdstuk 2** en **4**). Een samenvatting van de klinische studies in oculaire genterapieën, de rAAV vectoren (promotors, genen, polyadenylatie sequenties), de rAAV tropisme studies, en het transgen en de bio-activiteit assay's zijn beschreven in **hoofdstuk 1**.

Het ontwikkelen en karakteriseren van een relevant ziektemodel voor RP-*CRB1* in muizen- en menselijke cellen is beschreven in **hoofdstuk 2+4+5**. In **hoofdstuk 2** beschrijven we een nieuw RP-*CRB1* muismodel (*Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup>) waarin we de *Crb1* expressie hebben verwijderd en de niveaus van het *Crb1* homolog *Crb2* in Müller gliacellen hebben verlaagd. Bovendien vergeleken we in muizen het *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> ELM-breuk fenotype met drie al eerder gepubliceerde RP-*CRB1* muizen. We vonden een negatieve correlatie tussen het aantal ELM-breuken en de totale hoeveelheid van CRB (CRB1/CRB2) eiwitten. Dat laat zien dat de hoeveelheid CRB belangrijk is en niet specifiek de CRB1 of CRB2 eiwitten. De vraag is hoe belangrijk de CRB1 of CRB2 eiwitten bij het ELM in fotoreceptoren en Müller gliacellen zijn. Interessant was dat het verwijderen van CRB-eiwitten in staafjes een minder erge ELM-fenotype veroorzaakte dan het verwijderen van CRB-eiwitten in Müller gliacellen. Dat betekent dat een rAAV-gebaseerde therapie bij voorkeur ook Müller cellen en niet alleen fotoreceptoren moeten infecteren. Verder hebben we gezien dat een lage CRB-eiwit-expressie in Müller gliacellen al beschermend is, toen we het fenotype van de *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> muizen vergeleken met een eerder gepubliceerd fenotype waar *Crb2* geheel verwijderd was (*Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>ΔMGC</sup>). De *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> muizen hadden een beter behoud van netvliesmorfologie, al te zien in 1 maanden oude dieren. Dus de adhesie van neuronale netvliescellen is bijzonder afhankelijk van de *CRB*-expressie in glia (Grieks voor "lijm") cellen.

Om een functionerend netvlies in muizen over langere tijd te behouden is het echter belangrijk dat *Crb2* in Müller gliacellen tot een natuurlijk niveau wordt gebracht. De *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> muizen verloren eerder hun gezichtsvermogen in vergelijking met *Crb1*<sup>KO</sup> control dieren, gemeten met behulp van opto-kinetische hoofd-tracking respons (OKT) en electroretinogrammen (ERGs). Ook werden vroege morfologische fenotypen gezien, zoals verlies van buitenste/binnenste segmenten van fotoreceptoren en een toename van verschoven fotoreceptorkernen in de subretinale ruimte (boven de ELM) van over de ELM in de subretinale ruimte. Ook wanneer de *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> netvliesen werden blootgesteld aan stress door een lage dosis van een Müller gliaceltoxine (DL-AAA) dat een afbraak van de ELM veroorzaakt, was een maand later het zicht verminderd zoals gemeten met ERG's en OKT's. Hieruit blijkt dat het herstelvermogen van het *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> netvlies lager is ten opzichte van de netvliesen van wildtype en *Crb1*-knockout muizen.

Wanneer codon-geoptimaliseerde humane *CRB1* of *CRB2* cDNA met behulp van rAAV genterapie vectoren wordt toegediend aan *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> Müller gliacellen dan kan

het morfologische fenotype, veroorzaakt door de toxine, worden voorkomen. Het humane CRB1 of CRB2 eiwit is dus in staat om de ELM-stabiliteit of ELM-herstel in *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCs</sup> muizen te verhogen. Interessant is dat alleen de rAAV-*CRB2* behandeling het netvlies beschermd tegen verlies aan gezichtsvermogen, zoals gemeten met OKT en ERG. De met rAAV-*CRB1* behandelde ogen vertoonden een ongewenste toename van geactiveerde microgiale cellen en neovascularisatie in de ganglioncellaag (GCL) en het corpus ciliare. Deze en eerdere studies tonen aan dat de CRB1 en CRB2 eiwitten compenserende en overlappende functies hebben in het neuronale netvlies en dat rAAV-*CRB2* een veelbelovende kandidaat is voor de eerste RP-*CRB1* klinische studies.

Het eiwitomhulsel (capside) van het rAAV-deeltje bepaalt welke cellen worden geïnfecteerd (tropisme), in welke mate (potentie), en hoe gemakkelijk het door enzymen wordt afgebroken of aan de herkenningstaak van het immuunsysteem ontsnapt (capside stabiliteit en potentie). De infectie van een cel met het rAAV wordt gefaciliteerd door oppervlaktereceptoren op de gastheercel (zie ook **hoofdstuk 1**). Bovendien kunnen de oppervlaktereceptoren verschillend zijn naargelang de diersoort, waardoor het rAAV tropisme op menselijke cellen of niet-menselijke primaten moet worden onderzocht. In **hoofdstuk 3** hebben we een nieuwe rAAV transgeen expressie assay opgezet om (a) het tropisme van rAAV capsiden in parallel te screenen op humane donor neuroretina (*ex vivo*) en (b) de algehele morfologie intact te houden gedurende 21 dagen. In **hoofdstuk 4** hebben we drie verschillende rAAVs (rAAV9, rAAV5 en rAAV6-afgeleide ShH10<sup>Y445F</sup>) getest op hun potentie om de doelwitcellen van het RP-*CRB1* netvlies te infecteren: Müller gliacellen en fotoreceptorcellen. We tonen aan dat rAAV5 en rAAV6-afgeleide ShH10<sup>Y445F</sup> op efficiënte wijze de Müller gliacellen kunnen infecteren van retinale explantaten van menselijke donoren en menselijke geïnduceerde pluripotente stamcel (hiPSC)-afgeleide retinale organoïden. Beide rAAV's infecteerden ook fotoreceptoren op retinale explantaten van menselijke donoren. Verrassend genoeg overtroffen zij ook de infectiepotentie van rAAV9 op drie verschillende virusconcentraties (titers). Eerder toonde rAAV9 een uitstekend infectieprofiel in *in vivo* muisstudies. De resultaten op menselijk materiaal tonen aan dat (a) verschillen in diersoort de potentie en tropisme kunnen beïnvloeden en dat (b) rAAV5 een kandidaat is voor de *CRB1* rAAV-getherapie voor RP-*CRB1* patiënten.

Tenslotte, in **hoofdstuk 4** en **hoofdstuk 5**, onderzochten we hoe RP-*CRB1* gemodelleerd kan worden in een menselijk netvlies. Wij laten zien dat we retinale organoïden kunnen genereren uit hiPSCs van drie verschillende gezonde donoren (controles zonder bekende mutaties). In de controle-organoïden vinden we belangrijke celtypen (fotoreceptoren, Müller gliacellen, amacrine cellen, horizontale cellen, ganglioncellen, RPE-cellen) in de verschillende lagen van het netvlies terug. Wij tonen aan in organoïden en foetale retina's dat tijdens de ontwikkeling van het netvlies, het CRB2 eiwit veel eerder tot expressie op de ELM komt dan het CRB1 eiwit. In de oudere retinale organoïden wordt CRB1 aangetroffen in de sub-apicale

regio van fotoreceptoren en Müller gliacellen, terwijl CRB2 wordt aangetroffen de sub-apicale regio van fotoreceptoren en apicale Müller glia-villi. De locatiestudie van het eiwit op immuno-elektronenmicroscopie toont aan dat CRB1 een prominentere rol heeft in de menselijke neuroretina vergeleken met muizennetvlies. In het muizennetvlies wordt namelijk CRB2 gevonden in zowel fotoreceptoren als ook in Müller gliacellen, terwijl CRB1 alleen aanwezig is in Müller gliacellen.

Ten tweede, de RP-*CRB1* organoïden, die werden gegenereerd uit hiPSC donorlijnen van drie patiënten met RP-*CRB1*, vertoonden een netvliesfenotype bestaande uit protrusie van fotoreceptorkernen over de ELM in de subretinale ruimte. Dit fenotype hadden we eerder waargenomen in *Crb1* en *Crb2* RP muismodellen. Interessant is dat de ELM in RP-*CRB1* organoïden niet alleen een verlies laten zien van de sub-apicale en adherens junction-eiwitten inclusief variant CRB1 eiwit, maar ook een sterke afname van het apicale NOTCH1. In controle-organoïden vinden we een nog niet eerder beschreven interactie van CRB1 en NOTCH1 op hun extracellulaire domeinen (ECD). Deze interactie is grotendeels verloren gegaan in RP-*CRB1* organoïden. Dit wijst erop dat CRB1 belangrijk is voor de rekrutering van NOTCH1 of de stabilisatie van NOTCH1 op de ELM. Eerder is aangetoond dat LCA-*CRB1* muizen een overactieve Notch-pathway hebben. De CRB1-NOTCH1 ECD-interactie zou hier een belangrijke rol in kunnen spelen.

Tenslotte moeten CRB1 en NOTCH1 getransporteerd en continu gerecycled (turn-over) worden door het endolysosomaal systeem nabij de ELM. We vinden een toename in de hoeveelheid aan vroege endosomen en een toename van late endosomale afbraakvesikels. Dat lijkt gekoppeld te zijn aan een afname van RAB11A-positieve recycling-endosomen in RP-*CRB1* organoïden. Onze hypothese is dat het verlies van CRB1 op de ELM de rijping van vroege endosomen tot recycling-endosomen remt, waardoor het aantal afbraakvesikels toeneemt. Ook vonden we een toename van WDFY1 eiwitten (in het bijzonder in endosomen) in RP-*CRB1* organoïden, evenals een mRNA overexpressie van *Wdfy1* in RP-*CRB1* muizen. De WDFY1 en NOTCH1 eiwitten zouden interessante biomarkers voor *CRB1* gentherapie kunnen worden. Helaas is er nog weinig bekend over de functie van *WDFY1* en het endolysosomaal systeem in het neuronale netvlies. Vooral het specifieke aansturen van het endolysosomale systeem om intracellulaire ziekteprocessen te remmen, zou in de toekomst een significantere rol kunnen spelen. Maar eerst is er meer onderzoek nodig om de (sub-)populaties van endosomen in netvlies te karakteriseren in RP en controle-organoïden, om het effect van het aansturen van het endolysosomaal systeem beter te kunnen voorspellen.

Samengevat beschrijven wij de generatie en analyse van RP-*CRB1* muizen in **hoofdstuk 2** en menselijke RP-*CRB1* organoïden (*CRB1*<sup>M1041T/M1041T</sup>, *CRB1*<sup>Y631C/E995\*</sup> en *CRB1*<sup>M1041T/C948Y</sup>) in **hoofdstuk 4 en 5**. De gegevens tonen aan dat de menselijke RP-*CRB1* ziekte gereproduceerd kan worden in muizen en in menselijke organoïden. Vervolgens laten we zien dat rAAV-*CRB* gentherapie op Müller gliacellen van de *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>LowMGCS</sup> muizen

het netvlies kan beschermen tegen stress-geïnduceerd zichtverlies en dat humaan *CRB2* cDNA superieur is aan humaan *CRB1* cDNA (**hoofdstuk 2**). We ontwikkelden een verbeterde rAAV tropisme assay op menselijke donorretina's (**hoofdstuk 3**). Vervolgens laten we zien dat rAAV5 efficiënt humane Müller gliacellen en fotoreceptoren kan infecteren, de twee voornaamste doelcellen van een RP-*CRB1* gentherapie. Ook presteerde rAAV5 beter dan rAAV9 in infectiestudies op menselijke retinale organoïden en menselijke donorretina's (**hoofdstuk 4**). Zowel menselijke modellen als muismodellen verschaffen dus nieuwe inzichten in retinale degeneratie en rAAV-gentherapieën.