



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Targeting for success: mechanistic insights into microRNA-based gene therapy for Huntington disease

Sogorb Gonzalez, M.

Citation

Sogorb Gonzalez, M. (2023, February 9). *Targeting for success: mechanistic insights into microRNA-based gene therapy for Huntington disease*.

Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3515739>

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/1887/3515739>

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

Nederlandse Samenvatting

De Ziekte van Huntington (HD/ZvH) is een fatale neurodegeneratieve ziekte die veroorzaakt wordt door een CAG-repeat-expansie in exon 1 van het huntingtin-gen (HTT). Deze mutatie veroorzaakt een verlengde polyglutaminestring in het mutant HTT eiwit, wat leidt tot eiwit gerelateerde toxiciteit door eiwit aggregatie en wat uiteindelijk in celdood resulteert. Vanwege de genetische monogene achtergrond en onmiskenbaar polyglutamine afhankelijke toxiciteit is mutant HTT-eiwit het ideale doelwit voor veel therapieën in ontwikkeling.

Een van de meest geavanceerde HTT exon 1 verlagende benaderingen is gebaseerd op een microRNA (miRNA) gerelateerde gentherapie, bestaande uit een gemanipuleerde miRNA gericht op HTT (miHTT) en word afgeleverd door adeno-geassocieerd virus (AAV) die vanaf nu aangeduid zal worden als "AAV-miHTT". De directe toediening van AAV-miHTT in het striatum van diermodellen heeft de werkzaamheid aangetoond door het verlagen van het mutante HTT eiwit, het redden van ZvH-fenotypen en de veiligheid in toxicologische onderzoeken bij niet-menselijke primaten. Gedurende de laatste jaren hebben relevante studies in het veld aangetoond dat de ZvH-pathologie erg complex is waarbij er wordt gediscussieerd over nieuwe hypothesen zoals de oorzaak en de progressie van de ziekte. De eerste klinische onderzoeken suggereren het gebrek aan effectiviteit in naar mutante HTT verlaging en dat de verlaging van het mutant HTT eiwit mogelijk niet voldoende is om de progressie van de ziekte te vertragen.

Dit proefschrift beschrijft nieuwe mechanistische inzichten met betrekking tot miRNA gebaseerde gentherapieën, waaronder het behandelen van verschillende HTT eiwit types, de therapeutische verspreiding tussen neuronale cellen en de ontwikkeling van translationele biomarkers om het effect ervan in de aangetaste hersengebieden te volgen.

Hoofdstuk 1 is een algemene inleiding op het gebied van de ZvH en bevat een actuele uitgebreide analyse van de meest relevante vragen en uitdagingen die nodig zijn voor de ontwikkeling van succesvolle therapieën. We beschrijven wat, hoe en waar de ziekte zich tot moet richten/behandelen en de belangrijkste resultaten om de werkzaamheid (hoe goed) en toxiciteit (hoe slecht) te beoordelen om een optimale vertaling naar patiënten te garanderen.

Toenemend bewijs geeft aan dat naast het mutante HTT-eiwit van volledige lengte er exon 1 HTT (HTTex1) fragmenten gegenereerd worden door een afwijkende splicing activiteit die zeer vatbaar zijn voor aggregatie en extensief bijdragen aan de ZvH-pathologie. Het genereren van pathogene HTTex1 correleert sterk met CAG-herhalingsexpansie en somatische instabiliteit. De langzame maar gestage accumulatie van HTTex1 eiwit in de loop van de tijd zou kunnen verklaren waarom ZvH-patiënten neurodegeneratie en symptomen

ontwikkelen in het volwassen leven. Deze bevinding suggereert ook dat het verminderen van de expressie van HTT_{ex1} transcripten een groter therapeutisch voordeel zou kunnen opleveren dan het alleen richten op de mutante HTT van volledige lengte en omgekeerd. Strategieën die zich uitsluitend richten op HTT van volledige lengte zouden de pathogenese van de ZvH niet kunnen voorkomen. In **hoofdstuk 2** evalueerden we het vermogen van AAV5-miHTT om de niveaus van afwijkend gesplitst HTT_{ex1} in de hersenen van twee muismodellen van de ZvH te verminderen. Intrastriatale toediening van AAV5-miHTT resulteerde in een dosisafhankelijke significante verlaging van zowel de mutant HTT als HTT_{ex1} van de volledige lengte in het striatum en de cortex van Q175 knock-in en gehumaniseerde Hu128/21-muizen na respectievelijk twee en vier maanden. Deze resultaten tonen aan dat AAV5-miHTT-getherapie een efficiënte benadering is om zowel HTT van volledige lengte als de zeer pathogene HTT_{ex1}-niveaus te verlagen, en het toegevoegde therapeutische voordeel van HTT_{ex1} gerichte therapieën voor de ZvH te ondersteunen.

Een van de grootste uitdagingen bij de behandeling van hersenziekten is het bereiken van een adequate biodistributie en dekking van alle aangetaste hersengebieden evenals een duurzaam effect in de tijd. Hiervoor zijn preklinische studies bij grote dieren belangrijk voor een succesvolle vertaling naar patiënten. In **hoofdstuk 3** onderzochten we de vertaling en lange termijn werkzaamheid van AAV5-miHTT toegediend in het striatum bij transgene ZvH minivarkens. We hebben aangetoond dat directe intrastriatale toediening van AAV-miHTT-therapie resulteert in wijdverbreide en aanhoudende HTT eiwitverlaging in alle hersengebieden. Mogelijke betrouwbare biomarkers om expressie en therapeutische werkzaamheid te volgen werden ook onderzocht. Deze studie, samen met afzonderlijke toxicologische studies, was essentieel om de klinische ontwikkeling van AAV5-miHTT in de kliniek te ondersteunen.

Met betrekking tot het werkingsmechanisme van AAV-miHTT hebben we een nieuw mechanisme voorgesteld voor de uitscheiding en verspreiding van getherapieën die worden gemedieerd door extracellulaire vesicles (EV). In **hoofdstuk 4** hebben we de secretie van gemanipuleerde miRNA's onderzocht en het mogelijke gebruik ervan als geschikte markers om de expressie en duurzaamheid van getherapieën in de hersenen te volgen. Bovendien werden meetbare gemanipuleerde miRNA niveaus verrijkt in EV's gedetecteerd in het CSF van niet menselijke primaten tot 2 jaar na intrastriatale infusie. Deze resultaten ondersteunen het gebruik van EV geassocieerde miRNA's als nieuwe translationele farmacokinetische markers in de huidige klinische onderzoeken naar getherapieën voor neurodegeneratieve ziekten.

Mechanismen die therapieën verspreiden buiten de aanvankelijk getransduceerde cellen, kunnen bijdragen aan de eliminatie van intracellulaire ziekteverwekkende eiwitten

in alle aangetaste hersencellen en regio's en uiteindelijk ziekteprogressie voorkomen. In **hoofdstuk 5** hebben we de EV-gemedieerde functionele overdracht van AAV geleverde therapeutische microRNA moleculen van AAV-miRNA gecorrigeerde neuronale cellen naar naburige cellen onderzocht. We hebben de opname van EV's door neuronale cellen aangetoond en de werkzaamheid van miRNA's om doelgenen te verlagen bij overdracht naar de ontvangende cel.

Hoofdstuk 6 een algemene bespreking van de belangrijkste bevindingen van dit proefschrift in de context van ZvH veld- en miRNA gebaseerde gentherapieën voor neurodegeneratieve ziekten. We bespreken verder de behoeften en toekomstperspectieven voor een succesvolle gentherapie voor de behandeling van de ZvH en andere neurodegeneratieve ziekten.

