



Universiteit  
Leiden  
The Netherlands

## Viral gene therapy approaches for CRB1 retinal disease

Boon, N.

### Citation

Boon, N. (2023, November 2). *Viral gene therapy approaches for CRB1 retinal disease*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3655975>

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/1887/3655975>

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

## Nederlandse Samenvatting

Crumbs-homoloog-1 (CRB1) is een groot transmembraan eiwit dat zich in het netvlies bevindt. Het bevat een extracellulair domain met meerdere epidermale groei factor (EGF) en laminin-A globulaire domeinen, evenals een intracellulair domein met een geconserveerd PDZ bindingsmotief. CRB1, CRB2, en CRB3 behoren tot de Crumbs familie, waarvan CRB1 en CRB2 zich in het netvlies bevinden. Er zijn meer dan 200 verschillende *CRB1* mutaties beschreven die zich over het gehele *CRB1* gen verspreiden. Deze mutaties kunnen erfelijke degeneratieve aandoeningen van het netvlies veroorzaken zonder een duidelijke genotype-fenotype correlatie; voorbeelden zijn retinitis pigmentosa (RP) en Leber congenitale amaurosis (LCA). De klinische variabiliteit van de start en de ernst van een netvlies degeneratie, zelfs in een familie met dezelfde homozygote mutatie, suggereert dat er modifierende factoren betrokken kunnen zijn bij het tot uiting komen van het fenotype. Tot op heden is er nog geen behandelbaarheid voor patiënten met mutaties in het *CRB1* gen.

Aangezien *CRB1*-gerelateerde RP en LCA een divers ziektebeeld vertonen, zijn er meerdere diermodellen ontwikkeld die elk verschillende fenotypen van patiënten nabootsen: vier LCA en tien RP-achtige muismodellen. In **Hoofdstuk 2**, worden nog twee RP-achtige muis modellen beschreven: *Crb2*<sup>ARods</sup> en *Crb1*<sup>KO</sup>*Crb2*<sup>ARods</sup> muizen. In dit hoofdstuk tonen we aan dat muizen met een tekort aan het CRB2 eiwit in staafjes fotoreceptoren RP ontwikkelen, en dat er een verergerd fenotype optreedt wanneer in deze muizen ook het CRB1 eiwit in Müller Glial cellen (MGC) afwezig is. Het verminderde zicht werd gemeten door middel van OKT contrast gevoeligheid metingen bij deze muizen. Deze meting kan waardevol zijn voor latere experimenten met adeno-geassocieerde virale vector (AAV)-gemedieerde gentherapie om verbeteringen in het functionele zicht te beoordelen. In **Hoofdstuk 3** hebben we het fenotype van ratten met een spontane mutatie in het *Crb1* gen beschreven. De eerste tekenen van retinale degeneratie werden waargenomen vanaf postnatale dag 10 (p10) in het netvlies van deze ratten. Op de leeftijd van 1 maand werd al een statistisch significante verslechtering van de netvliesfunctie gemeten met een electroretinogram (ERG) bij deze *Crb1* mutant ratten. Bovendien konden we de netvliesdegeneratie bij individuele

ratten op verschillende tijdstippen visualiseren met behulp van spectraal-domein Optical Coherence Tomography (SD-OCT).

In dit onderzoek was het essentieel om de verschillen tussen knaagdieren en mensen goed te bestuderen. Daarom werd de sub-cellulaire lokalisatie van het CRB1 en CRB2 eiwit bepaald met behulp van immuno-elektronen microscopie. In **Hoofdstuk 3** wordt aangetoond dat de endogene expressie van het CRB1- en CRB2-eiwit in Brown Norway ratten overeenkomt met eerdere bevindingen in de muis retina. Echter, recente studies op niet-humane primaten, humaan foetaal retina, en humaan-afgeleide netvlies organoïden tonen een andere lokalisatie van het CRB1- en CRB2-eiwit. Dit benadrukt opnieuw het belang van het gebruik van humaan-afgeleide modellen voor gentherapie, waar mogelijk.

In **Hoofdstuk 4 en 5** werd gebruik gemaakt van humaan geïnduceerde pluripotente stamcel (hiPSC) afgeleide netvlies organoïden. **Hoofdstuk 4** beschrijft netvlies organoïden afkomstig van *CRB1*-patiënten, terwijl **Hoofdstuk 5** zich richt op *CRB1*<sup>KO</sup> en *CRB1*<sup>KO</sup>*CRB2*<sup>+/-</sup> netvlies organoïden. Zowel de netvlies organoïden afkomstig van *CRB1*-patiënten als de *CRB1*<sup>KO</sup> en *CRB1*<sup>KO</sup>*CRB2*<sup>+/-</sup> netvlies organoïden tonen een significante afname van fotoreceptor kernen in een rij, en meer fotoreceptoren boven de buitenste limiterende membraan (OLM), in vergelijking met de isogene controles. Single-cel RNA-sequensen in **Hoofdstuk 4** toont aan dat de expressieniveaus van het *CRB1* transcript vergelijkbaar zijn tussen de *CRB1* patiënt-afgeleide netvlies organoïden en de isogene controles, terwijl het CRB1 eiwit duidelijk verminderd is in *CRB1* patiënt-afgeleide netvlies organoïden. Dit geldt ook voor de *CRB1*<sup>KO</sup> en *CRB1*<sup>KO</sup>*CRB2*<sup>+/-</sup> netvlies organoïden in vergelijking met de isogene controle, waarbij ook een verminderd CRB1 eiwit op de OLM wordt waargenomen (**Hoofdstuk 5**). Samengevat vertonen zowel de *CRB1* patiënt-afgeleide netvlies organoïden als de *CRB1*<sup>KO</sup> en *CRB1*<sup>KO</sup>*CRB2*<sup>+/-</sup> netvlies organoïden een vergelijkbaar fenotype als wat wordt waargenomen bij patiënten. Dit maakt beide modellen bruikbaar voor verdere AAV-gemedieerde gentherapie studies.

Voordat de mogelijkheid van gentherapie met behulp van AAV kan worden bestudeerd, is het belangrijk om de AAV-tropisme in ratten (**Hoofdstuk 3**) en in netvlies organoïden (**Hoofdstuk 4 en 5**) te onderzoeken. Subretinale injectie van AAV2/5 en AAV2/9 in ratten resulteerde in transductie van het retinaal pigmentepitheel (RPE) en fotoreceptoren, terwijl de AAV6 variant ShH10<sup>Y445F</sup> zowel de RPE, fotoreceptoren, MGC, als andere cel types in de INL transduceerden. Intravitreale injectie van AAV2/5 en AAV2/9 toonde een relatief lage transductie efficiëntie van zowel fotoreceptoren als cellen in de INL, maar na intravitreale injectie van ShH10<sup>Y445F</sup> werd een efficiënte transductie van voornamelijk MGC waargenomen. Om deze reden is in **Hoofdstuk 3** gebruik gemaakt van ShH10<sup>Y445F</sup>.hCRB voor verdere AAV-gemedieerde gentherapie toepassingen bij de *Crb1* mutant ratten. AAV2/5 en AAV2/2 zijn onderzocht in **Hoofdstuk 4** voor de transductie van jonge controle organoïden, terwijl in **Hoofdstuk 5** oudere controle organoïden werden gebruikt. Zowel AAV2/2 als AAV2/5 transduceerden fotoreceptoren, MGC, en andere cellen in de INL op een efficiënte wijze, waarbij AAV2/5 net iets efficiënter was in de transductie van cellen in de INL (inclusief MGC). Om de doelcellen (fotoreceptoren en MGC) in de netvlies organoïden te transduceren, is AAV2/5.hCRB gebruikt in **Hoofdstuk 4 en 5** voor verdere mogelijkheden van gentherapie.

Voorafgaand onderzoek heeft aangetoond dat AAV-gemedieerde *CRB2* gentherapie succesvol was in het beschermen van netvlies degeneratie in *Crb1* RP muis modellen. Daarom werd in **Hoofdstuk 3** de toepasbaarheid van gentherapie onderzocht in de *Crb1* mutant ratten met ernstige en vroeg beginnende netvliesdegeneratie. Helaas werd er geen verbetering waargenomen in het degeneratieve fenotype, vanwege de ernstige degeneratie die al op jonge leeftijd aanwezig was bij deze ratten. Dit suggereerde dat vroegtijdige expressie van recombinant CRB-eiwitten nodig is om de degeneratie in deze *Crb1* mutant ratten tegen te gaan. Daarnaast werd AAV-gemedieerde *CRB* gentherapie onderzocht op humaan-afgeleide netvlies organoïden (**Hoofdstuk 4 en 5**). In **Hoofdstuk 4 en 5** werd het RP fenotype gedeeltelijk verbeterd na behandeling met AAV.hCRB2, wat resulteerde in een herstel van de hoeveelheid fotoreceptor kernen in een rij. Bij de *CRB1* patiënt-afgeleide netvlies organoïden (**Hoofdstuk 4**) werd ook een gedeeltelijke verbetering van het fenotype waargenomen na AAV.hCRB1 behandeling.

Single cel-RNA sequentie analyse van AAV behandelde *CRB1* patiënt-afgeleiden netvlies organoïden toonde ook een gedeeltelijk herstel van de transcript expressie van genen die gerelateerd zijn aan het endosomale systeem.

In conclusie, in dit proefschrift hebben we (1) het fenotype van *CRB1* mutant muizen, ratten, en humaan-afgeleide netvlies organoïden getoond, (2) de verschillen in AAV-tropisme in diverse modellen weergegeven, en (3) we hebben AAV.h*CRB* gemedieerde gentherapie succesvol toegepast in *CRB1* patiënt, *CRB1*<sup>KO</sup>, en *CRB1*<sup>KO</sup>*CRB2*<sup>+/-</sup> netvlies organoïden. De data die in dit proefschrift wordt beschreven, is van belang voor toekomstige gentherapie studies in patiënten met een mutatie in het *CRB1* gen.