

## Voortgangsrapportage juni 2018

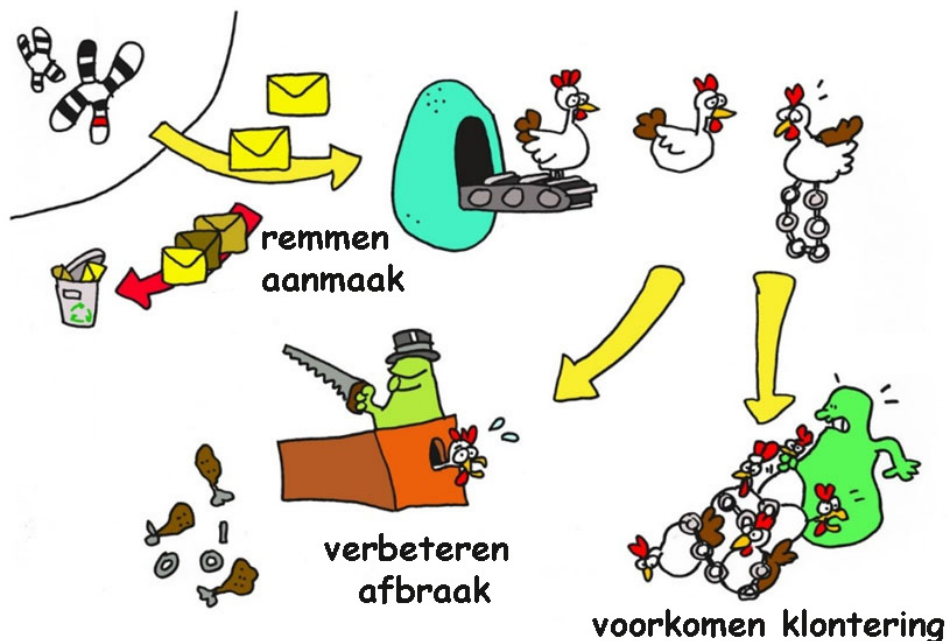
Die ziekte van Huntington wordt veroorzaakt door een mutatie in het DNA dat codeert voor het Huntington eiwit (HTT). Door de lange CAG repeat in het DNA krijgt het HTT eiwit een lange reeks glutamine aminozuren, ook wel polyQ genoemd (Q is de afkorting voor het aminozuur glutamine). Wanneer deze reeks 40 of meer Q's bevat zal het HTT eiwit klonteringen vormen in de hersencellen, met onder meer verlies van communicatie tussen verschillende hersencellen als gevolg.

Het Campagneteam Huntington werft met vele betrokkenen fondsen voor onderzoek die hierop ingrijpen, aangrijpingspunten zoekende voor een therapie voor Huntington. Dit kan door:

- de vorming van de klontergevoelige HTT fragmenten te voorkomen (pagina 2)
- klonteringen zelf te voorkomen door middel van chaperonnes (pagina 3)
- de afbraak van de HTT fragmenten door de vuilnismannen in de cel te verbeteren (pagina 4)
- het screenen van bestaande medicijnen (compounds) die ergens in deze route ingrijpen (pagina 5).

Inmiddels zijn er 5 onderzoekslijnen gestart in Leiden, Groningen en Amsterdam, en start binnenkort de 6<sup>e</sup> onderzoekslijn. De gehele financiering van deze lijnen is nog niet binnen dus fondsen werven blijft hard nodig! Ook om nieuwe onderzoeken mogelijk te maken, en vervolgstappen. Maar met 2 jaar is al 2 miljoen euro opgehaald en kon veel onderzoek al van start.

De meeste lijnen zijn nu een half jaar bezig en we geven in afstemming met de betrokken onderzoekers een voortgangsverslag van de activiteiten. We zijn heel trots dat we dit met zijn allen al mogelijk hebben gemaakt en vragen iedereen actief betrokken te blijven en samen meer bekendheid te geven aan de ziekte van Huntington en te helpen bij fondsenwerving voor het lopende en geplande onderzoek!



## Remmen van de aanmaak van klontergevoelige huntington eiwitfragmenten

### **Project 1: Antisense oligonucleotide therapie voor de ziekte van Huntington**

Dr. Willeke van Roon-Mom, LUMC Leiden en Dr. Pontus Klein, ProQR Therapeutics, Leiden

De ziekte van Huntington (HD) wordt veroorzaakt door het gemuteerde huntingtin (HTT) eiwit. Het eiwit wordt in de cel in kleinere fragmenten geknipt, waarbij sommige fragmenten de mutatie bevatten, een lange reeks van glutamine-aminozuren (polyQ genoemd, de CAG repeat). Dit lange stuk klittenband doet het eiwitfragment klonteren. Doel van dit project is het voorkomen dat deze klontergevoelige fragmenten gevormd worden. Het samenwerkingsproject tussen LUMC en ProQR Therapeutics richt zich op het HTT messenger-RNA (mRNA), de boodschapper die leidt tot de aanmaak van het HTT eiwit. Door de RNA boodschapper te modificeren wordt het eiwit resistent tegen een dergelijke toxische splitsing. Op deze manier willen wij voorkomen dat het HTT eiwit schadelijke fragmenten vormt, zonder dat het de belangrijke natuurlijke functies van het HTT eiwit beïnvloedt. Om dit te bereiken maken wij gebruik van een zogenaamde antisense oligonucleotide (ASO), die ervoor zorgt dat het deel van het mRNA wordt overgeslagen dat codeert voor de splitsingsplaats. Hierdoor wordt een korter maar verder identiek HTT eiwit geproduceerd.

In het eerste gedeelte van het CTH project wordt de ASO, oorspronkelijk uitgevonden door het LUMC, geoptimaliseerd door verschillende ontwerpen te testen, zoals verschillende sequenties, chemische modificaties en lengtes. Dit alles draagt bij aan de meest optimale efficiëntie van het uiteindelijke geneesmiddel. Met behulp van fibroblast cellen afkomstig van Huntington patiënten zijn een groot aantal sequenties uitgebreid getest, waarin ook is gekeken naar de effecten en uitkomsten van het gemodificeerde RNA. Een kleiner aantal kandidaat-moleculen werd geïdentificeerd in de eerste testronde, die vervolgens in een tweede testronde verder zijn geoptimaliseerd. Deze kandidaat-moleculen zijn in een reeks van verschillende concentraties getest, waarin niet alleen is gekeken op het niveau van RNA, maar ook op HTT eiwitniveau. Computergestuurde modellering heeft het mogelijk gemaakt om verdere potentiële verbeteringen in de ASOs te identificeren, die vervolgens in cellen zijn geëvalueerd. De resultaten van deze inspanningen zijn ook geverifieerd in gekweekte menselijke Huntington hersencellen.

Hoewel het optimaliseren van kandidaat-geneesmiddelen in gekweekte cellen een goede start is, is het ook van cruciaal belang om de activiteit van de ASOs in levende proefdieren te testen. In tegenstelling tot de omstandigheden in een Petri schaalte spelen factoren zoals metabolisme en distributie van het medicijn door het dichte hersenweefsel een belangrijke rol. Daarom zijn de meest veelbelovende kandidaten geselecteerd en zetten we de evaluatie voort in een Huntington muismodel. Deze muizen vertonen vergelijkbare symptomen als Huntington patiënten. Uit deze studies hebben we veelbelovende eerste resultaten gezien, met activiteit van de kandidaat-geneesmiddelen in het gehele brein van de muis, inclusief de meest getroffen hersengebieden bij de ziekte van Huntington. Dit deel van het project is nog volop aan de gang, en met de definitieve resultaten willen we het beste kandidaat-medicijn selecteren voor de verdere klinische ontwikkeling.

## Remming van de klonteringen van mutant Huntington eiwit door de chaperonne DnaJB6.

De ziekte van Huntington wordt veroorzaakt door een verlenging van een CAG-repeat (stukje DNA) in het huntingtin gen. Hierdoor krijgt het huntingtin eiwit (HTT) een verlenging van een reeks aminozuren (glutamines, afgekort Q), waardoor het HTT een grote kans heeft om te gaan klonteren in hersencellen.

Alle cellen hebben systemen die de kwaliteit van eiwitten controleren en ongewenste klontering tegengaan: chaperonne eiwitten. Cellen hebben veel verschillende chaperonnes en onze onderzoeksgroep heeft ontdekt dat een daarvan, DNAJB6, zeer actief is in het voorkomen van klontering van het mutante HTT. In onze 2 toegekende projecten proberen we om de werking van dit eiwit in hersencellen te stimuleren met chemische stoffen (potentiele geneesmiddelen), en de eigenschappen van dit eiwit te gebruiken om het functionele deel in een therapeutische molecuul te verpakken.

### **Project 2: Verbetering van de bestaande activiteit van DNAJB6.**

Prof. dr. Harm H Kampinga en Dr. Steven. Bergink, UMCG Groningen

In dit project doen we een “indirecte” screen, waarin we de klontering van HTT kunnen meten met behulp van een geautomatiseerde microscoop. Hierbij wordt naar compounds gezocht die HTT aggregatie verminderen in cellen met DNAJB6, maar die geen effect hebben in cellen zonder DNAJB6 (de zogenaamde counter-screen). Zo weten we of effectieve compounds werken via activatie van DNAJB6.

Hiervoor hebben we cellijnen gemaakt voor aanvang van het project, maar die moesten worden “omgebouwd” in verband met patent-gerelateerde problematiek. Dit is inmiddels afgerond en de cellijnen zijn (opnieuw) volledig gevalideerd. De optimalisatie van de microscopische analyses in het Fraunhofer IME ScreeningPort (in Hamburg, Duitsland) met deze cellijnen is nu in volle gang. We verwachten nu dat binnenkort de compound screen kan worden gestart.

Daarnaast is een nieuwe techniek opgezet voor een “directe screen” waarbij we kunnen onderzoeken of er compounds zijn die de structurele eigenschappen van de chaperonne DNAJB6 zodanig veranderen dat deze meer actief wordt. We hebben nu namelijk bewijs voor het feit dat structurele dynamiek van het DNAJB6 molecuul erg belangrijk is voor diens activiteit. Deze assay zal in de komende maand worden gevalideerd in samenwerking met het UK Cambridge Drug Discovery Institute.

### **Project 3: Het werkzame deel van de chaperonne DNAJB6 inbouwen in een therapeutisch molecuul.**

Prof. dr. Harm Kampinga en Drs. Els Kuiper, UMCG Groningen

Met dit project zijn we bewust pas recent gestart, wetende dat er door andere onderzoekers gewerkt werd aan de opheldering van de meer precieze structuur van DNAJB6. Die data zijn inmiddels beschikbaar en we zijn nu net gestart met de eerste experimenten om, op grond van deze data, eerst het minimale fragment van DNAJB6 te vinden dat voldoende is om HTT aggregatie tegen te gaan. Daarna is het de bedoeling om dat DNAJB6 fragment in te bouwen in een stabiel matrix molecuul zodat je het als medicijn zou kunnen toedienen. Daarvoor zullen verschillende matrix moleculen worden getest.

**Project 4: Identificatie en manipulatie van enzymen betrokken bij de markering van HTT voor afbraak**

Prof. Dr. Eric Reits , Dr. Karen Sap, Dr. Alexandra Bury, Dr. M. Tuohetahuntala, AMC  
Amsterdam

De centrale vraag is: waarom wordt het gemuteerde HTT eiwit niet efficiënt afgebroken en is het in staat om op te hopen en te aggregeren? Wanneer eiwitten afgebroken moeten worden (omdat ze oud of beschadigd zijn) worden ze gemarkeerd voor afbraak door middel van een label, ubiquitine. Een gelabeld (of geubiquitineerd) eiwit wordt door het proteasoom (de vuilnismann van de cel) herkend en letterlijk gerecycled tot losse aminozuren, de bouwstenen voor nieuwe eiwitten.

Recent heeft onze onderzoeksgroep aangetoond dat in gekweekte cellen het HTT eiwit door de mutatie niet meer efficiënt gelabeld wordt met ubiquitine. De enzymen die hiervoor zorgen herkennen kennelijk het Huntington eiwit niet meer omdat het door de mutatie veranderd is van vorm. Hierdoor blijft efficiënte ubiquitinering uit en wordt het mutante Huntington eiwit niet herkend door het proteasoom. Willen we het mutante HTT eiwit beter opruimen, dan zullen we dus de ubiquitinering moeten verbeteren, en de hiervoor benodigde enzymen identificeren en activeren.

Afgelopen jaar hebben we in de hersenen van Huntington muismodellen bestudeerd wat de verschillen zijn in markering/ubiquitinering tussen het gezonde Huntington eiwit en het mutante Huntington eiwit. Ook bekenen we of er veranderingen waren in de niveau's van betrokken enzymen, zoals de verschillende ubiquitinerende enzymen maar ook chaperonnes, vuilnismannen etc. De uitkomsten bevestigen de eerdere resultaten die we in gekweekte cellen zagen, en toonden ook verschillen in betrokken enzymen –die nu stuk voor stuk getest gaan worden.

Momenteel kijken we meer in detail naar deze veranderingen in verschillende hersendelen. Het HTT eiwit komt in alle hersendelen voor maar sommige gebieden zijn erg gevoelig. Zijn er verschillen in de herkenning, markering en de afbraak van HTT? Daarnaast zijn we gestart met de optimalisatie om het HTT eiwit uit hersenen te isoleren, met als doel de betrokken enzymen mee te isoleren. Isolatie van deze associërende eiwitten, en verschillen tussen geassocieerde eiwitten met gezond en mutant HTT, moeten leiden tot identificatie van betrokken enzymen en zo mogelijk manipulatie van hun activiteit om de markering van het mutante HTT eiwit te verbeteren.

## Screenen van bestaande medicijnen in een HTT celmodel

### **Project 5: Compound screen met als doel verbeteren van HTT**

Prof. Dr. Eric Reits , Dr. Sabine Krom, Drs. Jolien Jansen, AMC Amsterdam

Naast hypothese-gedreven onderzoek zoals het voorkomen van HTT fragment vorming (project 1), het activeren van chaperonnes (project 2) of het nabootsen van chaperonne functie (project 3), de identificatie van enzymen betrokken bij de markering van HTT voor afbraak (project 4) en het verbeteren van de functie van de vuilnismen (project 6, start tweede helft 2018), willen we ook bestaande bibliotheken van 'small molecule compounds' testen of ze werkzaam zijn in de verbeterde afbraak van HTT. Compounds die een effect geven moeten dan verder getest worden: zijn ze specifiek, hoe werken ze, waar grijpen ze op aan? Maar zo is mogelijk wel een bocht af te snijden van de weg van het vinden van een aangrijpingspunten tot het maken van een medicijn. Tegelijk is het wel schieten met een schot hagle: de trefkans is onzeker, zit er iets bij dat effectief en specifiek (genoeg) is?

In samenwerking met het Centre for Drug Design and Discovery (Cistim) in Leuven hebben we een grote screen opgezet waarbij een bibliotheek van bijna 300.000 small molecule compounds (bestaande medicijnen) worden getest in een door ons opgezette en gepatenteerde assay. Hierbij willen we compounds selecteren die de ophoping en klontering van mutant HTT eiwit in hersencellen moeten tegengaan. Effectieve compounds worden vervolgens getest op efficiëntie, specificiteit en werkingsmechanisme, en uiteindelijk in Huntington proefdiermodellen.

Er werden 2 verschillende assays opgezet die verschillen in het aangrijpingspunt van een medicijn:

1. Screenen naar compounds die de polyQ repeat reeks (het klittenband deel van HTT) herkennen, de klontering tegengaan en afbraak ervan verbeteren.
2. Screenen naar compounds die specifiek de markering van het HTT verbeteren voor herkenning en afbraak door de vuilnismannen. Er zijn verschillende enzymen betrokken (onderzocht in project 4) en doel is om compounds te identificeren die deze enzymen beïnvloeden, en daarmee markering voor afbraak verbeteren.

Effectieve compounds moeten dan verder onderzocht worden:

- Werken de effectieve compounds ook in gekweekte hersencellen met Huntington?
- Zijn de effectieve compounds selectief (genoeg) of beïnvloeden ze ook andere eiwitten?
- Hebben ze ook effect op gezond Huntington eiwit?
- Verbeteren ze het functioneren van hersencellen met Huntington?
- Hoe werken de compounds, activeren ze eiwitafbraak, voorkomen ze klontering?

De eerste screen werd met een bibliotheek van 300.000 compounds gedaan met gekweekte hersencellen waarin het 'pure' stuk verlengde klittenband (de polyQ reeks) werd gemaakt. Door een rode, lichtgevende stof te gebruiken die deze polyQ reeksen herkent werd zichtbaar welke compounds de klontering van eiwitten effectief tegengaan en afbreken. Er bleken 54 compounds te zijn die de klontering van de polyQ reeks verminderde. Hiervan bleken er 12 ook effectief te zijn in het verminderen van klontering door het mutante HTT eiwit. Uiteindelijk waren er 2 compounds over die weinig bijwerkingen hadden op andere eiwitten, en deze 2 worden verder onderzocht. Het geeft ook meteen de enorme trechter aan met deze aanpak: met 300.000 beginnen en met 2 verder gaan, waarvan de geschiktheid en effectiviteit nog onderzocht moet worden.

De tweede screen mikt op verbetering van de markering van HTT voor afbraak. Deze assay is gebaseerd op ons recent onderzoek en bevindingen uit project 4, en is afgelopen maanden getest qua geschiktheid voor compound screens met geautomatiseerde microscopen en robots. Momenteel worden er drie verschillende screens mee opgezet:

- Een screen met eenzelfde grote compound library (die op alle mogelijke enzymen kan ingrijpen)
- Een screen met een selectieve compound library die aangrijpt op enzymen betrokken bij markeringen voor afbraak
- Een screen waarin alle 600 potentieel betrokken ubiquitinerende enzymen en co-factoren 1 voor 1 geremd worden. Identificatie van een cruciaal enzym betrokken bij HTT markering is dan direct een aangrijpingspunt voor een medicijn die dat enzym kan activeren.

De tweede screen werkt direct met het mutante HTT eiwit waardoor we een tussenstap overslaan, en focust met name op het verbeteren van de markering voor afbraak, en aanlevering aan de vuilnisman.