

Update onderzoek Campagneteam Huntington

November 2022



**Campagneteam
Huntington**



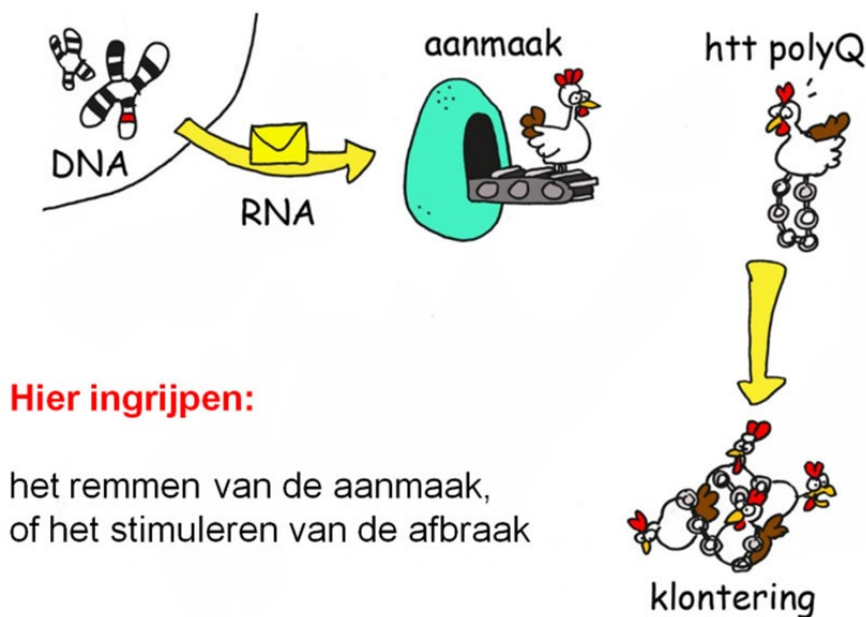
Inhoudsopgave

Achtergrond	3
Onderzoek prof. Harm Kampinga - UMCG	5
Onderzoek prof. Eric Reits - AmsterdamUMC	7
Onderzoek dr. Stefan Rüdiger – Universiteit Utrecht	11
Onderzoek dr. Willianne Vonk - Prinses Maxima Centrum	12
Onderzoek prof. dr. Patrick van der Wel – Universiteit Groningen	14

Achtergrond

Het Campagneteam Huntington is in 2016 gestart met het werven van fondsen voor het financieren van onderzoek dat mikt op een therapie voor Huntington. Een therapie die het mutante huntington eiwit verlaagt (huntington lowering) en daarmee de ziekte kan voorkomen, vertragen en mogelijk zelfs leidt tot verbetering.

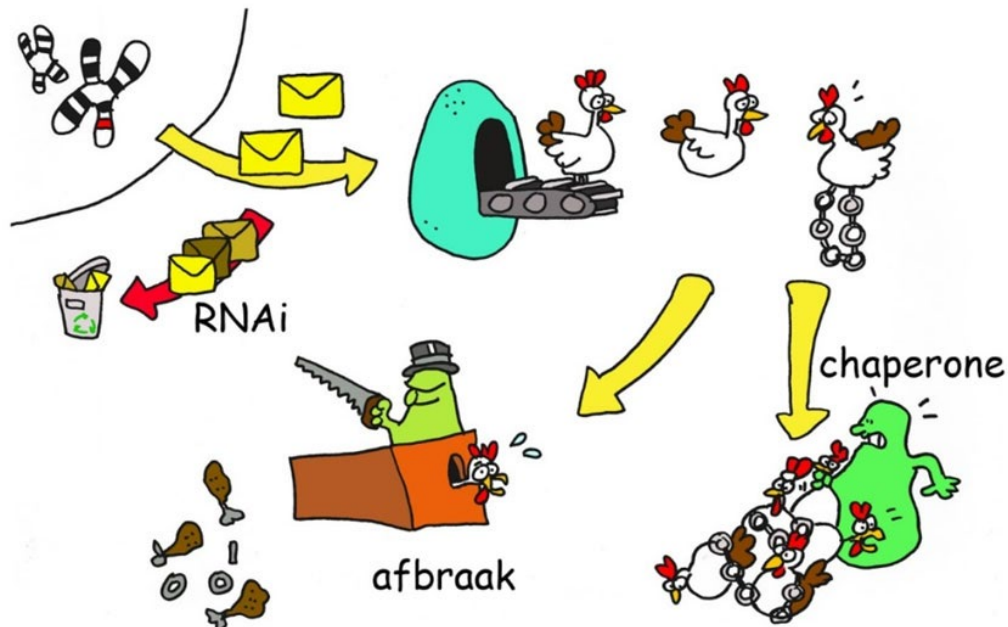
Het gemuteerde huntingtin eiwit (htt polyQ) vormt eiwitklontering in de cel. Dit is het gevolg van een mutatie in het DNA (waar het gen dat codeert voor huntington zit) dat je van je ouders erft, en je hebt 50% kans dat gemuteerde stukje DNA te erven als je vader of moeder gendrager is. Deze mutatie zit dan eveneens in de boodschap (RNA) die naar de eiwitfabriek in de cel gaat. Door de aanmaak te remmen of de afbraak van het huntingtin eiwit te bevorderen kan de ziekte voorkomen worden.



Verschillende onderzoeksgroepen in Nederland zetten in op onderzoekslijnen die direct aangrijpingspunten moeten opleveren voor een genezende therapie voor de ziekte van Huntington. De belangrijkste voorbeelden zijn:

- Specifieke onderschepping van het signaal binnen de cel dat het huntingtin eiwit gemaakt moet worden. Door het gebruik van zogenaamde anti-sense strategieën is een spiegelbeeld boodschap in cellen binnen te brengen die het signaal onderschept dat normaliter tot de aanmaak van huntingtin eiwitten leidt (onderschepping van de RNA boodschap vanuit het DNA naar de eiwit-fabrieken in de cel). Recentelijk zijn er strategieën ontwikkeld om dat ook bij Huntington te testen.
- Het voorkomen dat de gemuteerde huntingtin eiwitten gaan klonten. Er zijn verschillende zogenaamde chaperone eiwitten in de cel die voorkomen dat eiwitten verkeerde vormen aannemen of gaan klonten. Enkele van deze chaperones blijken in staat om de klontering van huntingtin tegen te gaan, maar ze komen normaliter niet tot expressie in de hersenen. Het activeren van deze chaperones in de hersenen zou klontering tegen moeten gaan, en de afbraak van huntingtin bevorderen.

- Het verbeteren van de afbraak van het huntingtin eiwit. Alle eiwitten in de cel worden na verloop van tijd weer afgebroken. De afbraak van het gemuteerde huntingtin verloopt echter erg inefficiënt. Recent onderzoek toont aan dat door de mutatie van huntingtin de herkenning door de afbraak enzymen (de 'vuilnismannen') heel inefficiënt is. Het bevorderen van herkenning, mede door de identificatie en activatie van betrokken enzymen zal de afbraak bespoedigen en klontering voorkomen.



Inmiddels zijn er verschillende onderzoekslijnen gestart, waarbij meerdere onderzoekslijnen al in de tweede fase zitten.

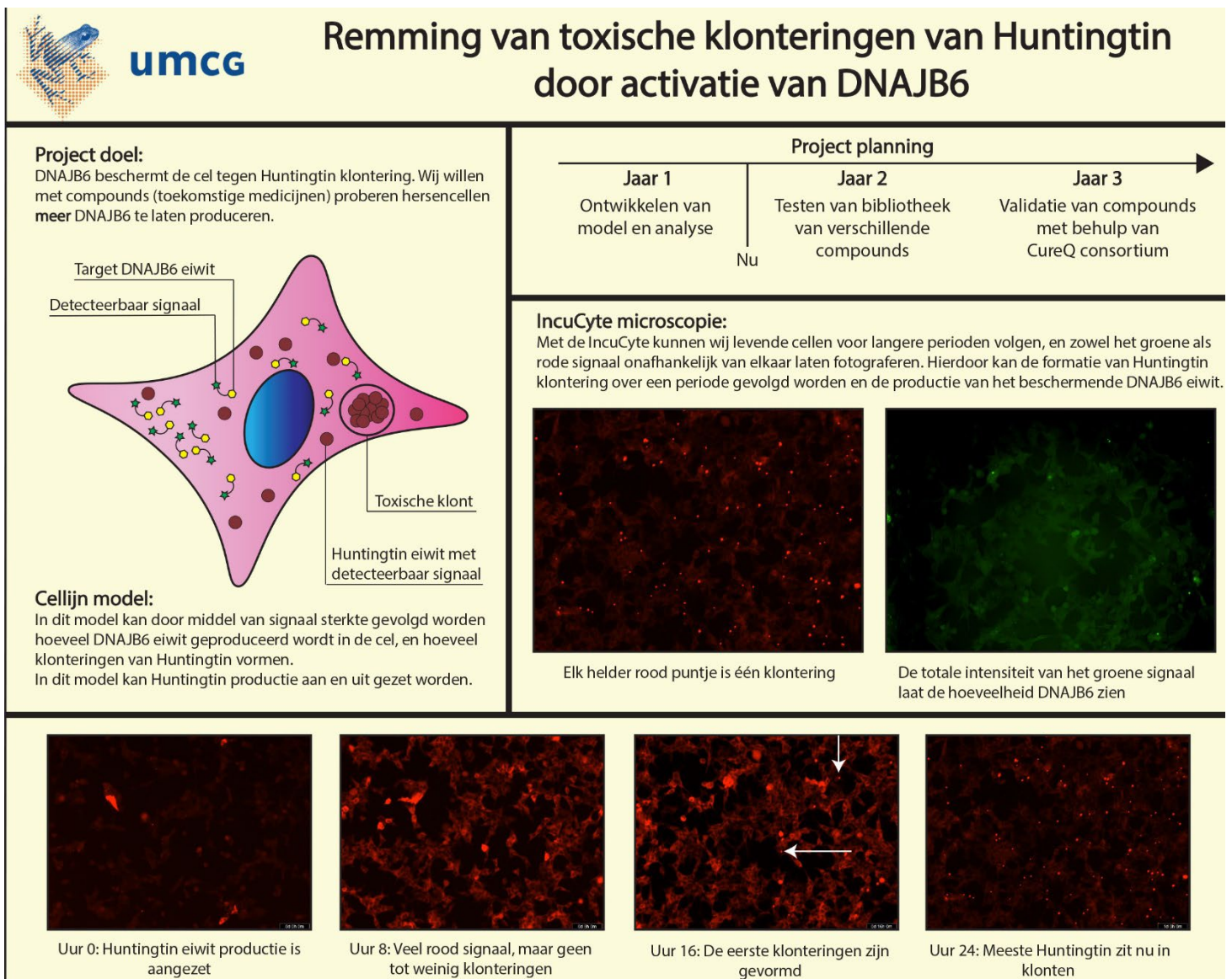
1. Prof. Harm Kampinga (UMCG) - fase 2
2. Prof. Eric Reits (AmsterdamUMC locatie AMC) – fase 2
3. Dr. Stephan Rudinger (Universiteit Utrecht)
4. Dr. Willianne Vonk (Prinses Maxima Centrum) samen met de Vereniging van Huntington
5. Prof. Patrick van der Wel (Universiteit Groningen)
6. Prof. Willeke van Roon (LUMC) en biotech proQR (Leiden) - fase 2

Daarnaast draagt het Campagneteam Huntington 150.000 euro bij aan het recent gestarte CureQ consortium (www.cureQ.nl) waarin de verschillende Nederlandse Huntington onderzoekers, neurologen en biotech samenwerken, en nieuwe potentiële therapieën voor Huntington ontwikkeld en gevalideerd zullen worden. Eric Reits is coördinator, Willeke van Roon en Harm Kampinga beiden projectleiders, en Willianne Vonk onderzoeksleider, waarbij ze resultaten uit lopende onderzoeken gefinancierd door het Campagneteam Huntington zullen voortzetten en valideren met gekweekte menselijke hersencellen.

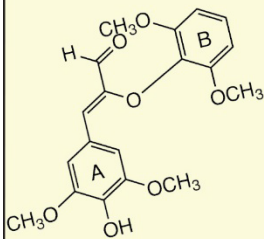
Met de nieuwe inkomsten uit acties en donaties kunnen we de vervolgonderzoeken mogelijk maken, en mogelijk ook nieuwe onderzoekslijnen financieren in Nederland, allen mikkend op een therapie die het mutante huntingtin eiwit verlaagt en zo de ziekte uitstelt, stop ten kan voorkomen.

1. Kampinga

In onze lichaamscellen helpen zogenaamde chaperone eiwitten bij het tegengaan van ongewenste klontervorming. Met eerder onderzoek (ook mede gefinancierd door het Campagneteam Huntington) heeft de onderzoeksgroep van prof. Harm Kampinga ontdekt dat de chaperone DnaJB6 de klontering van het huntington eiwit tegengaat. Deze chaperone herkent specifiek de lange polyQ repeat en voorkomt dat het eiwit gaat klonten. Wanneer in een muis proefdiermodel met Huntington de DnajB6 chaperone wordt verhoogd dan worden de muizen veel later ziek. Doel is nu om compounds/potentiële medicijnen te screenen die de aanmaak van deze chaperone stimuleren:

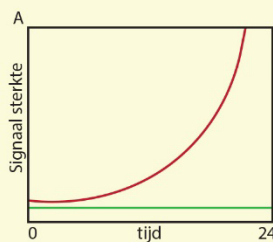
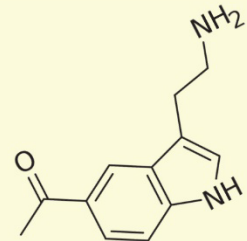


Er zullen compounds getest worden die ook over de bloed-hersen barrière komen, want bij voorkeur wordt een effectieve compound als pil ingenomen. De ideale compound verlaagt het aantal klonteringen door de aanmaak van de chaperone DnaJB6 te stimuleren:



Compound bibliotheek

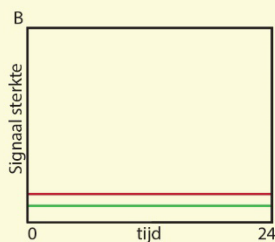
Met SPECS (Utrecht) opzetten van een compound bibliotheek. Hersenen worden goed beschermd d.m.v. de bloed-hersenbarrière dat weinig stoffen door laat. Daarom worden de compounds onder andere geselecteerd op de mogelijkheid dat ze deze barrière kunnen passeren en de hersencellen kunnen bereiken.



Grafiek A:

- Compound heeft geen effect
- Klontering nemen elk uur exponentieel toe
- DNAJB6 blijft stabiel

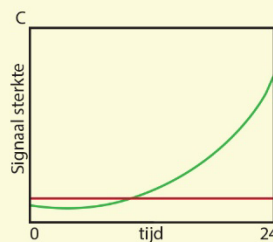
Geen Hit



Grafiek B:

- Compound heeft sterk effect
- Klontering is geremd zonder DNAJB6 toename

Vals positief



Grafiek C:

- Compound heeft sterk effect
- Klontering is geremd
- DNAJB6 neemt toe

Hit!

Grafische analyse resultaten:

De IncuCyte microscopie produceert tienduizenden foto's per test van ~88 verschillende verbindingen. Hiervoor is er een pijpleiding opgezet met verschillende software dat uiteindelijk één grafiek per verbinding produceert.

— Aantal klontering

— Totaal DNAJB6 signaal

2. Verbeteren van de afbraak van het mutante huntington eiwit (fase 2)

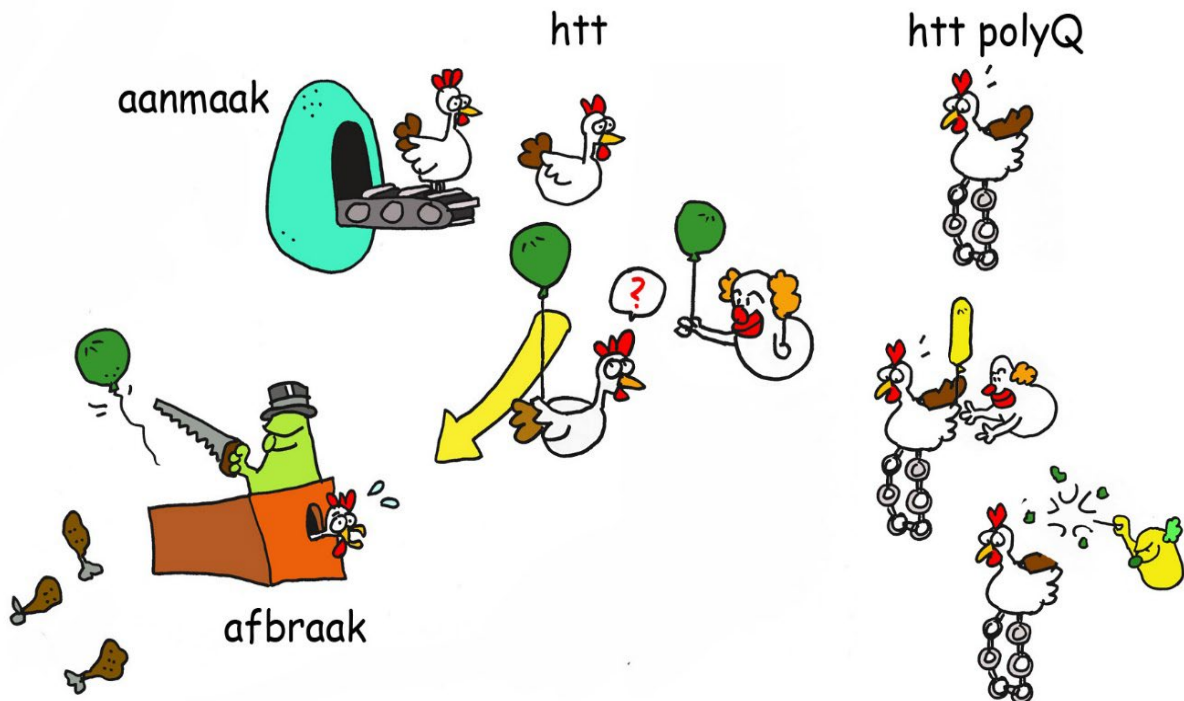
Eric Reits

Samenvatting project:

De Ziekte van Huntington wordt gekenmerkt door de ophoping en klontering van het mutante huntingtin eiwit (HTT) in de hersenen. Lang werd gedacht dat de vuilnismannen in de cel, de enzymen betrokken bij eiwitafbraak, niet in staat waren om het klontergevoelige huntington eiwit (HTT) af te breken en zelfs verstrikt raakten in de klonteringen. Ons onderzoek liet zien dat dat niet het geval was; de vuilnismannen blijven actief, en wanneer het mutante HTT kunstmatig gemarkeerd wordt voor afbraak dan wordt het geheel afgebroken.

Maar daar zat dus het probleem.

Eiwitten worden niet willekeurig afgebroken maar pas na markering met bepaalde stickers (ubiquitine genoemd). Onze recente onderzoeksresultaten tonen aan dat het mutante HTT anders (en slechter) gemarkeerd wordt en daardoor niet goed herkend wordt door enzymen betrokken bij eiwitafbraak. Dit bood een aangrijpingspunt om specifiek de herkenning en afbraak van het mutante HTT te verbeteren, en dat zijn we met twee vervolprojecten gaan doen, mogelijk gemaakt door het Campagneteam Huntington en de Reggeborgh stichting.



2A Identificatie en validatie van geïdentificeerde enzymen betrokken bij HTT markering

Herkenning van HTT voor afbraak gebeurt door markering van het eiwit door ubiquitines, stickers die door enzymen op af-te-breken eiwitten worden gezet. Pas dan wordt het eiwit daadwerkelijk opgeruimd. Het identificeren van de betrokken enzymen die de stickers er op kunnen plakken, maar ook de enzymen die die stickers (te vroeg) verwijderen is nu een prominente onderzoekslijn in onze groep. In de eerste fase van het project hebben we gezond en gemuteerd HTT eiwit geïsoleerd uit hersencellen, en geassocieerde enzymen betrokken bij de ubiquitinering geïdentificeerd door middel van massa spectrometrie (we vissen HTT uit cellen en enzymen die eraan plakken worden in stukjes geknipt waarna een specifiek apparaat die stukjes herkent en daarmee kan bepalen welk eiwit dat was). In de tweede fase willen we de rol van al deze enzymen in de afbraak van het HTT bepalen, door bijvoorbeeld hun activiteit te verlagen of te verhogen. Enzymen die daadwerkelijk de afbraak van HTT stimuleren vormen dan het aangrijpingspunt van een medicijn om de ophoping en klontering te voorkomen, en daarmee de ziekte te voorkomen, vertragen of zo mogelijk te genezen.

We hebben nu vooral interesse in enzymen die betrokken zijn bij de markering van eiwitten voor afbraak. We hebben ruim 80 enzymen geïdentificeerd die betrokken zijn bij markering van afbraak, en nog ruim 200 andere enzymen die bij afbraak in brede zin betrokken zijn.

1. Van deze 83 enzymen hebben we bekeken of ze in de hersengebieden die aangedaan zijn bij Huntington voorkomen, want sommige enzymen zijn specifiek voor bepaalde celtypen. Dat bleken er 56 te zijn, en deze werden geselecteerd voor stap 2.

2. Elk van deze 56 enzymen werd selectief 1 voor 1 uitgeschakeld in gekweekte hersencellen door middel van RNAi (knock-down, onderscheppen van het specifieke mRNA signaal). Deze hersencellen maken het HTT eiwit en ook een groene lichtgevende reporter die klonteringen van HTT kleurt in cellen. De hersencellen groeien in verschillende bakjes/welletjes, en in elk welletje werd 1 specifiek enzym uitgeschakeld. Onze geautomatiseerde microscoop maakte vervolgens veel foto's per bakje en een geschreven computer script telde het aantal cellen met HTT klonteringen. Van de 56 enzymen leidde de 'knockdown' van 20 enzymen tot een verlaging of verhoging van het aantal HTT klonteringen; zij hebben dus een direct of indirect op HTT ophoping.

3. Om uit te sluiten dat we geen enzymen overslaan omdat de knockdown/RNAi niet gewerkt zou hebben testen we of de aanmaak van deze enzymen wel degelijk verlaagd is. Door middel van Q-PCR werden de niveaus van de verschillende enzymen gemeten.

4. De effecten op HTT klontering kan een direct effect zijn (hopelijk), maar als de knockdown van een enzym indirect leidt tot toxiciteit, of verlaging van eiwitaanmaak in het algemeen, dan zal er ook minder HTT gemaakt worden. Deze vals-positieve uitkomst wil je al vroeg uitsluiten. Daarom zijn bij alle enzymen die een effect hadden twee assays gedaan: wordt ook de aanmaak van een niet-gerelateerd eiwit verlaagd, en wordt de vitaliteit van de cellen aangetast? Van de 20 enzymen die HTT klontering beïnvloedden waren er 10 die de vitaliteit of eiwitaanmaak beïnvloedden, en bleven er 10 over die verder getest zullen worden qua specificiteit en selectiviteit zoals beschreven in het oorspronkelijke plan.

In deze fase zijn we van 80 geïdentificeerde enzymen betrokken bij ubiquitinering naar 10 enzymen gegaan die HTT klontering beïnvloedden, maar geen specifieke bijwerkingen hebben op eiwitaanmaak en vitaliteit. Het microscopie script moest in de tussentijd herzien worden (we hebben een AI script voor automatische herkenning geschreven), de levering van benodigde plastics was vertraagd (een probleem voor alle laboratoria) en de bestelling en optimalisatie van de Q-PCR duurde langer dan

gepland. De vervolgstappen zullen in de lente van 2023 zeker afgerond zijn (werk door een analist op het project).

Om veel gevoeliger de ubiquitinatie van HTT te meten wilden we de mass spectrometer 'trainen' om selectief deze veranderingen te meten in hersenweefsel en hersencel lysaat. Normaliter zijn er vele duizenden geubiquitineerd eiwitten in een cel, en is het zoeken naar HTT een naald in een hooiberg. Om de mass spec te trainen maken we gebruik van targeted mass spec. De postdoc op dit project (Karen Sap) heft de specifieke HTT peptides laten synthetiseren, en vervolgens is de mass spec getraind om deze peptides specifiek te herkennen (de naald in de hooiberg). De optimalisatie voor verschillende HTT is geslaagd. Daarnaast willen we de eerdere bevindingen die gedaan zijn in muizen hersenen valideren in hersencellen die gekweekt zijn vanuit huidcellen van Huntington patiënten en gezonde personen. Vooral om zeker te zijn dat wat we zien in muismodellen ook echt representatief is voor mensen, maar ook om straks menselijke cellen te kunnen gebruiken in de studies om met medicijnen de enzymen te activeren. Hiervoor is het recent gestarte CureQ project essentieel, want hier worden de benodigde hersencellen met verschillende polyQ lengtes gemaakt en kunnen we effecten van onze enzymen testen.

2B. Compound screening: small molecule compounds die het mutant HTT selectief verlagen

Onze eerste screen opzet was gebaseerd op het visualiseren van het klonteren van het polyQ eiwitdeel in gekweekte hersencellen. Omdat er 9 polyQ ziektes zijn met elk een verlengde polyQ repeat leek het logisch om juist hier op te focussen. Het polyQ fragment werd in gekweekte cellen aangemaakt, en 48 uur na het toevoegen van verschillende small molecule compounds (300.000 verschillende compounds in totaal) werden de polyQ klonteringen gekleurd met een rood lichtgevende stof en waren het aantal cellen met klonteringen te tellen door een geautomatiseerde microscoop. Er bleken enkele honderden compounds te zijn die elk een effect hadden op polyQ fragment klontering. Veel hadden ook een effect op het functioneren van de cel en vielen af. Ruim 50 compounds bleven over, en hiermee werden vervolg experimenten gedaan qua effectiviteit en specificiteit om ook mutant HTT te verlagen. Dit heeft uiteindelijk geen selectieve compound opgeleverd, mogelijk omdat het mutant HTT en een klein polyQ fragment toch te verschillend zijn voor de afbraak machinerie in de cel. Een

klein pluspunt was wel dat we inmiddels ervaring hadden gekregen met zulke uitgebreide screens, de juiste assays voor selectiviteit en specificiteit... en dat we dus moesten focussen op mutant HTT zelf.

De fase 2 zou dus focussen op mutant HTT. Er zijn eerder screens uitgevoerd met HTT maar daarbij werd een lichtgevend eiwit aan het HTT gekoppeld. Onze experimenten toonden aan dat dit een artefact opleverde, want door deze koppeling werd het HTT anders afgebroken. We hebben een experimentele opzet gemaakt om (bestaande) medicijnen ofwel compounds te testen of die de afbraak van mHTT in cellen verbeteren. Hierbij gebruiken we hersencellen die we kunnen groeien in een petrischaal, en die het mHTT eiwit aanmaken. In deze cellen zit een onafhankelijke lichtgevende stof die klonteringen markeert, waardoor klonteringen van mHTT zichtbaar worden. Als medicijnen de afbraak van mHTT verbeteren, resulteert dat in minder ophoping en klontering, en daarmee ook een verlaging van het lichtgevende signaal (wat de computer kan meten). De geautomatiseerde microscoop maakt opnames van alle condities, en het programma identificeert de cellen en berekent het aantal cellen met klontering. Een pilot experiment met compounds die markeringen voor afbraak beïnvloeden gaf al verschillende zogenaamde 'hits'. In de uitgebreide screen wordt nu een grote bibliotheek van bestaande en nieuwe compounds getest, en worden effectieve compound vervolgens getest op specifieke effecten (functioneren van de cel, eiwitaanmaak), specificiteit (het gezonde HTT

eiwit mag niet verlaagd worden) en werkingsmechanisme. In dat laatste gaat nu het meeste tijd zitten: hoe werkt de compound, activeert die de vuilnismen, beïnvloedt die markering van HTT, wordt er wellicht een chaperone geactiveerd?

Daarnaast lopen inmiddels de eerste experimenten met een genetische screen. Hierbij worden in cellen individuele eiwitten uitgezet. Vergelijkbaar met de Roche en uniQure trial wordt de aanmaak van een specifiek eiwit verlaagd, in dit geval niet HTT maar telkens een van de honderden eiwitten betrokken bij eiwitafbraak. Het effect van het uitzetten van individuele enzymen betrokken bij eiwitafbraak wordt op dezelfde wijze gemeten als bij de compound screen.

Kleine vertragingen.

Sommige onderdelen van het onderzoek lopen langzamer dan gepland. Dat heeft verschillende oorzaken, variërend van vertraagde levering van benodigde artikelen tot nieuwe inzichten die een aanpassing van het project vragen. Door de coronacrisis zijn veel bedrijven gesloten geweest, en is er een groot tekort aan benodigde plastics zoals celkweekplaten. Maar er zijn ook nieuwe ontwikkelingen gaande die ons onderzoek beïnvloeden, en meer mogelijk maken (maar wel tijd kosten). Een voorbeeld is zogenaamde "targeted massspec" om zo met behulp van proteomics hele lage niveaus van huntingtin eiwit ubiquitineren te meten. Die niveaus zijn te laag om met antilichamen te meten, maar we hebben de detectie machines 'geleerd' de stukjes HTT met markering te herkennen. Dit maakt het mogelijk om in verschillende modellen en zelfs menselijk materiaal het HTT te meten, en effecten op HTT ubiquitineren te bepalen. Tenslotte zal het CureQ consortium zeer waardevolle modellen leveren om onze therapeutische strategieën te valideren, en kunnen we dat al als een fase 3 van deze projecten beschouwen.

3. CTH Project Stefan Rüdiger

1. Achtergrond

Bij de ziekte van Huntington is er sprake van een verlengde regio in het DNA van de patiënt. Deze afwijking in het DNA zorgt ervoor dat er een eiwit wordt afgeschreven, die zich niet normaal gedraagt: het Huntingtin eiwit. Dit eiwit heeft nu een nieuwe eigenschap, waarbij het gaat klonten. Dit proces heet ook wel aggregatie. Uiteindelijk vormen hierdoor steeds grotere klonten eiwit die ook wel fibrillen worden genoemd. Deze fibrillen zijn waarschijnlijk de oorzaak van het aftakelen van de hersenen waar de ziekte van Huntington om bekend staat. Ons doel is om de eiwitklontjes te herkennen, zodra die zich in het brein vormen. Dan kunnen we deze proberen op te ruimen voordat ze de grote fibril structuur aannemen.

2. Opmeten van eiwitklontjes

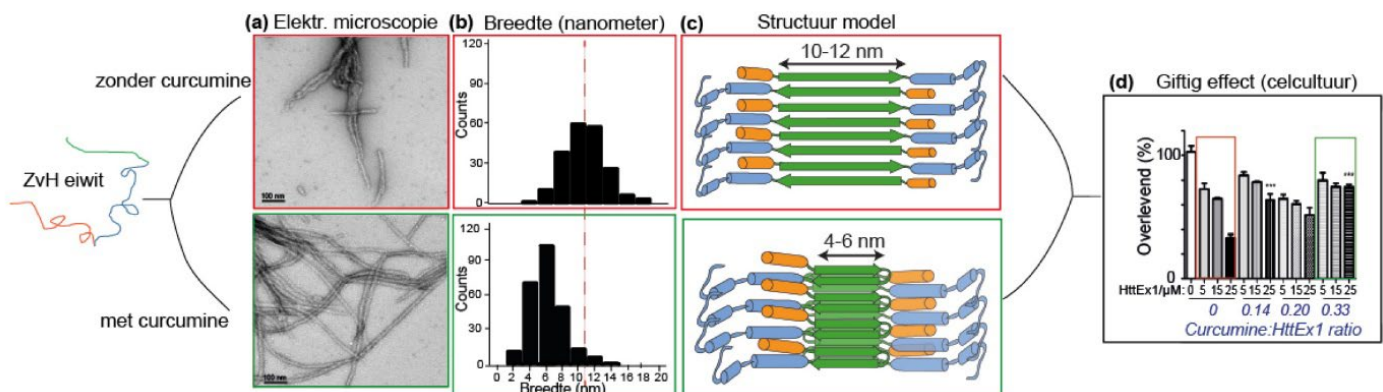
We hebben gewerkt aan een methode waarmee we kunnen vaststellen hoe groot de eiwitklontjes zijn. Het is namelijk zo dat het voor onderzoekers heel moeilijk is om de eerste vormen van aggregatie te herkennen, omdat deze zo klein zijn. Dit is echter heel belangrijk, omdat we zo vroeg mogelijk in patiënten willen vaststellen wanneer dit proces begint. Wij zijn nu in staat om het hele proces van aggregatie te volgen op het lab, waarbij we in staat zijn op de nanometer vast te stellen hoe groot het aggregaat op dat moment is.

3. Compound dat aggregatie kan herkennen

Ook hebben we gewerkt aan een compound, dat wil zeggen een chemische structuur, die zowel de eerste aggregatievormen als de fibrillen kan herkennen. Met onze nieuwe methode kunnen we testen of ook die eerste aggregatievormen herkend kunnen worden, en dat is inderdaad het geval. Tevens hebben we een aantal eigenschappen van deze compound vastgesteld, die van belang zijn om deze structuren te herkennen. Hiermee zouden we de compound nog verder kunnen verbeteren.

4. Volgende stappen

We kunnen nu dus elke stap van aggregatie herkennen. We zijn nu bezig om de compound zo te verbeteren, dat het ons lichaamseigen opruimingssysteem kan rekruteren. Dan zou je namelijk die eerste aggregatieproducten gelijk kunnen opruimen, wat ons hopelijk een stap dichterbij een therapeutisch middel brengt. Tot nu toe hebben we met kunstmatige Huntingtin eiwit klontjes gewerkt. In de volgende fase willen we de stap maken naar patiëntmateriaal.



4. Understanding the pathogenicity of mutant Huntingtin conformations and their modulation by the chaperonin TRiC/CCT

PI: Willianne Vonk

Doel van het project

Door een mutatie in het *huntingtine* gen, wordt er in patiënten met de ziekte van Huntington een foutief eiwit geproduceerd. Dit mutante huntingtine (mHTT) eiwit kan niet meer normaal functioneren en vormt gevaarlijke klonteringen (aggregaten) in het brein. Deze aggregaten kunnen verschillende belangrijke processen in de cel verstoren en uiteindelijk de zenuwcellen dusdanig beschadigen dat deze afsterven. Ondanks dat er een duidelijke correlatie is vastgesteld tussen de abnormale samenklontering van mHTT eiwitten en het verlies van zenuwcellen in de pathogenese van de ziekte van Huntington, begrijpen we nog niet precies hoe de aggregaten de cellen beschadigen en hoe we de samenklontering kunnen verminderen of tegengaan. Dit proberen we in ons onderzoeksproject, dat gesubsidieerd wordt door zowel de Vereniging van Huntington en het Campagneteam Huntington, te achterhalen.

Waarom is de chaperone TRiC zo belangrijk in de ziekte van Huntington?

Bepaalde typen eiwitten, de moleculaire chaperones, herkennen afwijkende of slecht functionerende eiwitten en kunnen helpen bij het herstellen van hun functies of opdracht geven aan de verschillende afbraakmachines in de cel om deze op te ruimen. Wij zijn erg geïnteresseerd in een van deze chaperones, TRiC/CCT genaamd. TRiC/CCT kan namelijk heel efficiënt de samenklontering van mHTT tegengaan en de zenuwsterfte in cel- en diermodellen van de ziekte van Huntington sterk verminderen. We weten echter niet welke samenstelling van samenklonterende mHTT eiwitten door TRiC/CCT herkend wordt. Als we hier meer inzicht in zouden hebben, kunnen we een strategie ontwikkelen gericht op het afremmen van het schadelijke mHTT aggregatieproces met het doel het ziekteproces vertragen.

Hoe remt TRiC de samenklontering van het foutieve huntingtine-eiwit (mHTT-eiwit)?

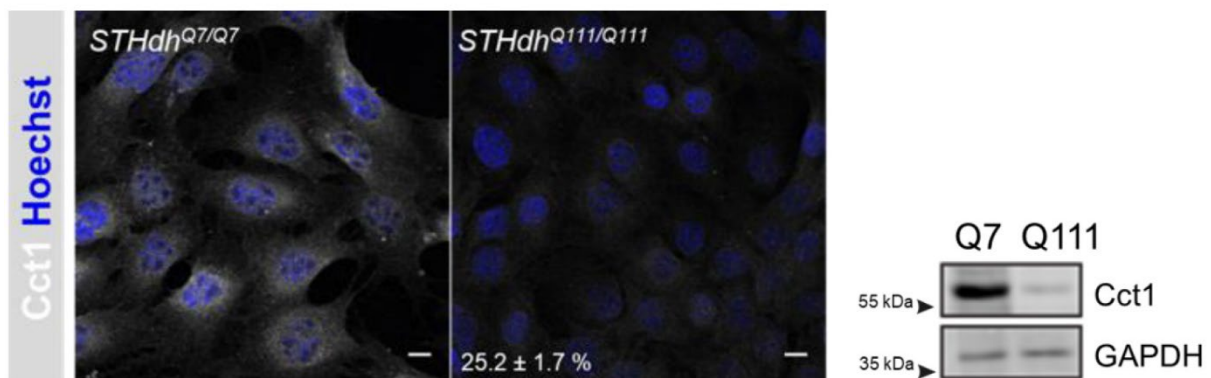
In ons onderzoek maken we gebruik van geavanceerde microscopie technieken waarmee we met hoge vergroting en resolutie de samenklontering van het mHTT in gekweekte zenuwcellen stap-voor-stap in detail kunnen bestuderen. Hiermee hebben we inmiddels kunnen aantonen dat TRiC/CCT al in een vroeg stadium van het mHTT eiwit aggregatieproces kan aangrijpen, en zeer waarschijnlijk niet alleen de grote aggregaten herkent maar ook al reageert met de zogenoemde oligomere amyloïde eiwitten. Dit zijn kleine aggregerende eiwit-structuren die aanwezig zijn in cellen die pathogeen mHTT tot expressie brengen, welke naar grote waarschijnlijkheid het meest schade kunnen aanrichten aan de zenuwcel. Onze resultaten impliceren dat TRiC, door juist specifiek te binden aan deze oligomere mHTT eiwitten in de cel, het aggregatie proces alsook de hoeveelheid celschade die aangericht kan worden, remt. Momenteel zijn we druk bezig deze bevindingen te bevestigen en nog beter te begrijpen wat de gevolgen zijn voor het mHTT eiwit als dit herkend wordt door de TRiC chaperone. We verwachten onze bevindingen in het komende jaar in de vorm van een wetenschappelijke publicatie openbaar te maken.

Verminderde aanwezigheid van TRiC door normale veroudering van ons brein, maar ook in hersenen van Huntington patiënten

Naast dat de kleine, schadelijke aggregerende eiwit-structuren verhoogd aanwezig zijn in zenuwcellen die mHTT tot expressie brengen, zien we ook dat de aanwezigheid van deze oligomere amyloïden verhoogd is in het verouderde brein en dus dat leeftijd een belangrijke

factor kan spelen in het aggregatieproces. Ons onderzoek heeft inmiddels aangetoond dat dit direct correleert met de aanwezigheid van de TRiC chaperone in de zenuwcellen. Inderdaad, de aanwezigheid van TRiC wordt verlaagd door veroudering van het brein. Daarbij blijkt nu dat ook specifiek in zenuwcellen die mHTT tot expressie brengen de chaperone sterk verminderd tot expressie komt. De verlaagde TRiC expressie kan dus direct bijdragen aan het mHTT aggregatieproces en de geassocieerde zenuwsterfte kunnen versnellen in het brein van een Huntington patiënt.

Onze recente bevindingen veronderstellen dus dat de hoeveelheid TRiC/CCT chaperone dat aanwezig is in de cel van essentieel belang kan zijn om het ontstaan van de schadelijke mHTT aggregaten tegen te gaan of te vertragen. Daarom streven wij ernaar om binnen ons onderzoeksproject nieuwe stoffen te identificeren die in staat zijn de TRiC/CCT expressie en/of functionaliteit binnen een cel te stabiliseren of zelfs te verhogen; hetgeen naar verwachting kan bijdragen aan het afremmen van het ziekteproces. We hebben hiervoor een uniek cel systeem opgezet waarbij we door middel van fluorescentie kwantitatief kunnen bepalen in welke mate TRiC tot expressie komt. Dit systeem zullen we gebruiken voor het testen van de potentie van verschillende bestaande medicijnen voor stabilisatie of verhoging van TRiC eiwit in de ziekte van Huntington. Dit zullen we de komende tijd verder onderzoeken.



Afremmen van ziekteproces door stabilisatie of verhoging van TRiC eiwit

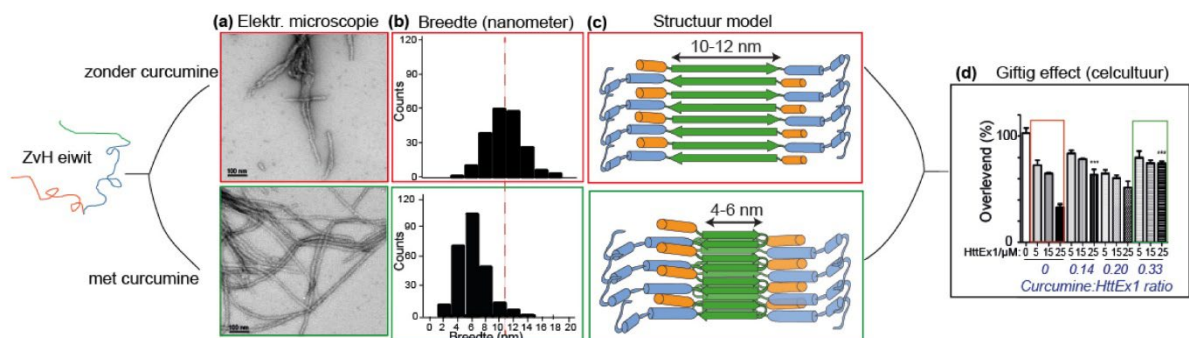
In vergelijking met gezonde cellen (STHdh^{Q7/Q7}), is de chaperone TRiC verminderd aanwezig in cellen die het mutante huntingtine-eiwit (111 CAG repeats; STHdh^{Q111/Q111}) tot expressie brengen (blauw zij celkernen, wit signaal is de chaperone TriC/Cct1)

5. Curcumine als potentiële compound om aggregatie van huntington tegen te gaan.

Patrick van der Wel

Delen van het gemuteerde huntingtine eiwit klonten samen in de hersenen van mensen met de ziekte van Huntington (ZvH), waarbij de hersencellen langzamerhand afsterven. In ons project kijken we naar de structuur van deze eiwit klonten om te zien of we ze kunnen voorkomen en/of omzetten in minder giftige eiwitvormen. Voor deze experimenten hebben we het eiwit in ons lab geproduceerd in zowel de gewone vorm als het gemuteerde eiwit. Ook in het lab vormt zo'n eiwit dan klonten (aggregaten). In de afgelopen periode hebben we vooral gekeken naar het gebruik van moleculen die het klonten-proces zouden kunnen veranderen of blokkeren. Met name hebben we gekeken naar een type van moleculen die ook al worden bestudeerd om eiwitklonting in de ziekten van Alzheimer en Parkinson te remmen. Moleculen zoals curcumine staan erom bekend dat ze dat kunnen doen, bovenop hun rol als antioxidant en hun ontstekingsremmende eigenschappen. We hebben nu in onze experimenten gekeken naar het effect van dit molecuul op het gedrag van het huntingtine eiwit. Ten eerste keken we naar het effect op het klontergedrag van het gemuteerde en normale eiwit (Q44-HttEx1 en Q32-HttEx1). Dat figuur toont de meetresultaten van een experiment waarin we de klonten detecteren: hoe hoger het signaal, hoe meer eiwitklonten er zijn. We zien dat beide eiwitten na ca. drie tot vijf uur spontaan klonten vormen. Maar, in bijzijn van curcumine gebeurt dat ruwweg twee keer zo langzaam! Dus dit molecuul is in staat het klontenproces sterk te vertragen!

Maar er worden uiteindelijk nog steeds klonten geproduceerd. In het figuur laten we zien hoe we die klonten met elektronenmicroscopie kunnen bekijken, ondanks het feit dat ze maar een paar nanometer breed zijn (duizenden keren dunner dan een menselijke haar). Wat heel interessant is, is dat ze er anders uitzien als ze tijdens zo'n curcumine behandeling gevormd zijn: klonten die vormen in bijzijn van curcumine zijn meer dan twee keer zo dun als normaal! Zo'n verschil zou van invloed kunnen zijn op het giftige effect van die klonten op (neuronaal) cellen. Om hier naar te kijken deden we ook metingen in het lab van Amalia Dolga: wat is het effect van onze eiwitklonten op neuronale Ht22 cellen van de muis hippocampus (in celcultuur)? Zoals te zien, blijken deze cellen inderdaad versneld af te sterven in bijzijn van onze eiwitklonten. Maar, wat heel interessant is, is dat de dunnere klonten die gevormd worden in bijzijn van curcumine juist minder giftig blijken te zijn! Schijnbaar zijn deze klonten minder gevaarlijk, in elk geval in deze lab-metingen.



Figuur – Van links naar rechts: huntingtine fragment HttEx1 vormt andere klonten met of zonder curcumine, gebaseerd op elektronenmicroscopie (a), met o.a. een duidelijk verschil in breedte (b). Deze breedtes suggereren een verschil in eiwit structuur, zoals te zien in onze modellen (c). In experimentele metingen met neuronale celcultuur blijken de twee typen eiwitklonten een verschillend effect te

hebben: de behandeling van het eiwit met curcumine reduceert het giftige effect van het huntingtine eiwit in dit experiment.

Het lijkt er dus op dat we op deze manier niet alleen de klontering vertragen, maar de eigenschappen van de gevormde klonten veranderen – met minder giftigheid tot gevolg. We zijn nu bezig met een verdere analyse van deze aggregaten om te kijken of we met o.a. NMR spectroscopie en structuurmodellen een verklaring kunnen geven over hoe curcumine dit precies voor elkaar krijgt, en of deze data inzicht geven in wat de giftigheid van een eiwitklont nu eigenlijk bepaalt.