

# TO TRIN TIL BEHANDLING AF ARVELIG CREUTZFELD-JAKOB SYGDOM

Aksel Hansen, Trille Reichel og Nicolas Magnussen

## fCJD - Når de små grå bliver meget få

Vi arbejder primært med arvelig Creutzfeld-Jakob sygdom, men der findes også en sporadisk opstående version.

Arvelig Creutzfeld-Jakob sygdom (fCJD) er en autosomal dominant prionsygdom, hvor prionproteiner (PrPc) misfoldes af en eller flere mutationer på proteinets gen. Denne misfoldelse medfører smitte af andre proteiner, og at prionproteinet ikke længere har en funktion (PrPsc) og derfor blot ophober sig i hjernen. Ophobningen og manglen på beskyttelse fra fungerende prionproteiner skader hjernen, og hjernens væv får store huller, der får den til at ligne en svamp. Patienter oplever akut demens, dårligt syn, stiv krop og spasmer. Alle patienter dør lige nu indenfor 2 år, oftest efter få måneder (1, 2, 3).

Sygdommen CJD forekommer i ca. 1 menneske pr. mio. pr. år og fCJD udgør ca. 10% af tilfældene, og har på nuværende tidspunkt ingen kurativ behandling, men kan behandles symptomatisk i enkelte tilfælde. Diagnose af fCJD stilles på baggrund af hukommelsestab - enten over en længere periode eller akut, rt-QuIC - en analysemetode, hvor spinalvæske rystes for at observere en stigning i mængden af misfoldet PrP og en genetisk analyse. (4, 5)

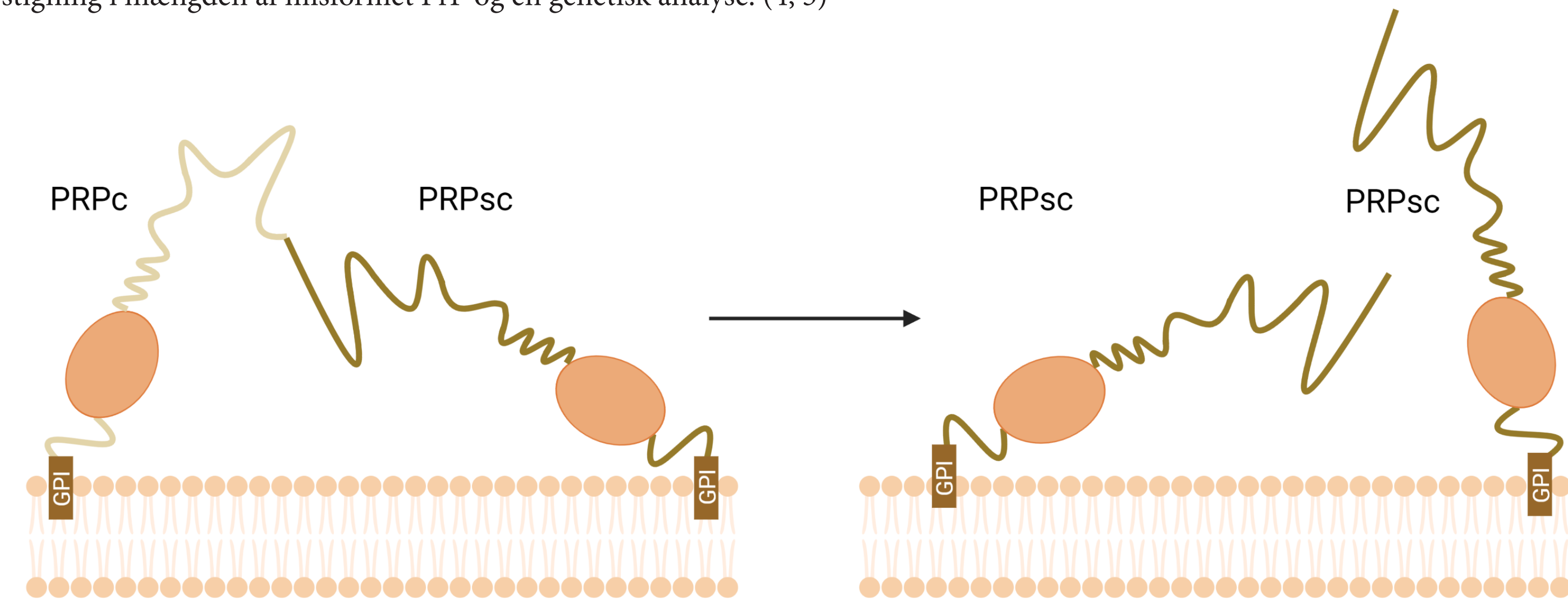


Fig. 1: PrPc smitter PrPc så begge bliver til PrPsc. Lavet i Biorender.com af gruppen.



Fig. 2: Tertiær struktur for menneskeligt prionprotein PrP. PDB accession: 1HJM. Lavet i Biorender.com af gruppen.

## Kilder

- (1), Appleby, B. & Manuelidis, L. (2023). National institute of neurological disorders and stroke. Hentet fra Creutzfeld-Jakob disease: <https://www.ninds.nih.gov/health-information/disorders/creutzfeldt-jakob-disease>
- (2), Eghiaian, F., Grosclaude, J., & al., E. (6. 7 2004). Insight into the PrPc → PrPsc conversion from the structures of antibody-bound ovine prion scrapie-susceptibility variants. PNAS. doi:https://doi.org/10.1073/pnas.0400014101
- (3), Langer, J. W. (2008). Nørdoktor. Hentet fra Creutzfeld-Jakob sygdom: <https://nordoktor.dk/sygdomme/fakta/kogalskab.htm>
- (4), Christensen, J., Bjørn, R. M., & Dorte, B. (30. 10 2022). Sundhed. Hentet fra Creutzfeld-Jakob sygdom: <https://www.sundhed.dk/sundhedsfaglig/laegehaandbogen/neurologi/tilstande-og-sygdomme/inflammatoriske-sygdomme/creutzfeldt-jakobs-sygdom/>
- (5), Gambetti, P., Et al., E. (1. 6 2003). Sporadic and familial CJD: classification and characterisation. Oxford Academic, s. 213-239. doi:https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.213
- (6), lab, Henrik's. (Instruktører). (2019). RNA -RNA interference [Film]. Youtube. Hentet fra <https://www.youtube.com/watch?v=zVe3Nom25pl>
- (7), Kim, Y.-K. (19. 4 2022). RNA therapy: rich history, various applications and unlimited future prospects. Experimental & molecular medicine, s. 455-465. doi:https://doi.org/10.1038/s12276-022-00757-5
- (8), Riesner, D. (1. 6 2003). Biochemistry and structure of PrPc and PrPsc. Oxford Academic, s. 21-33. doi:https://doi.org/10.1093/bmb/66.1.21
- (9), Conscha-Marambio, L., Diaz-Espinoza, R., & Soto, C. (31. 1 2014). The Extent of Protease Resistance of Misfolded Prion Protein Is Highly Dependent on the Salt Concentration. National center for biotechnology information. doi:10.1074/jbc.M113.513267
- (10), Müller-Hellwig, S. (29. 3 2006). Biochemical evidence for the proteolytic degradation of infectious prion protein PrPsc in hamster brain homogenates by foodborne bacteria. National center for biotechnology information. doi:10.1016/j.svamp.2005.07.010
- (11), Craik, C. S., Page, M. J., & Madison, E. L. (1. 4 2011). Proteases as therapeutics. National center for biotechnology information. doi:10.1042/BJ20100965
- (12), (21. 4 2023). PRNP prion protein [Homo sapiens (human)]. National center for biotechnology information. Hentet fra <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/5621>
- (13), Macks, C., & Lee, J. S. (8 2009). Non-viral Vector Mediated RNA Interference Technology for Central Nervous System Injury. Research gate. doi:10.1515/rnan-2016-0003
- (14), Lee, T. J., Schwartz, C., & Guo, P. (18. 4 2010). Construction of Bacteriophage Phi29 DNA Packaging Motor and its Applications in Nanotechnology and Therapy. National center for biotechnology information. doi:10.1007/s10439-009-9723-0
- (15), Barar, J., Rafi, M. A., Pourseif, M. M., & Omidi, Y. (5. 12 2016). Blood-brain barrier transport machineries and targeted therapy of brain diseases. National center for biotechnology information. doi:10.1517/bm.2016.30
- (16), Brown, D. R., Nicholas, R. S., & Canevari, L. (15. 1 2002). Lack of prion protein expression results in a neuronal phenotype sensitive to stress. National center for biotechnology information. doi:10.1002/jnr.10118
- (17), (u.d.). Kræftens bekæmpelse. Hentet fra Statistik om hjernetumorer: <https://www.cancer.dk/hjernetumorer-hjernesvulst/statistik-hjernesvulster/>

## RNA-terapi - en eftertragtet behandling?

RNA-terapi er et overordnet begreb, som dækker over forskellige måder at behandle sygdomme på vha. RNA. I vores projekt har vi valgt at bruge siRNA, men vi overvejede, om vi skulle bruge en aptamer i stedet.

siRNA (small-interfering RNA) indgår i RNAi (RNA-interferens), hvor siRNAet bliver optaget i RISC (RNA-induced silencing complex). RISC binder sig til mRNA, hvor siRNA har en komplementær sekvens. Når RISC er bundet til mRNA vil et enzym (Argonauto) i RISC katalysere nedbrydning af mRNAet eller blokere for translationen fysisk. Dette ville vi i projektet kunne bruge til at nedregulere ekspressionen af muteret PrP (PrPsc) (6, 7)

Aptamerer er en hel anden løsning. Denne består af forskellige stykker af RNA, som binder sig til proteiner eller molekyler for at ændre deres funktion, bindingsaffinitet eller lign. En aptamer ville vi evt. kunne bruge til at stabilisere PrPsc, så det ikke kan smitte andre raske prionproteiner (PrPc). (7) Vi fravalgte dog løsningen, da man ikke kan bestemme strukturen på N-terminalen på PrPsc.

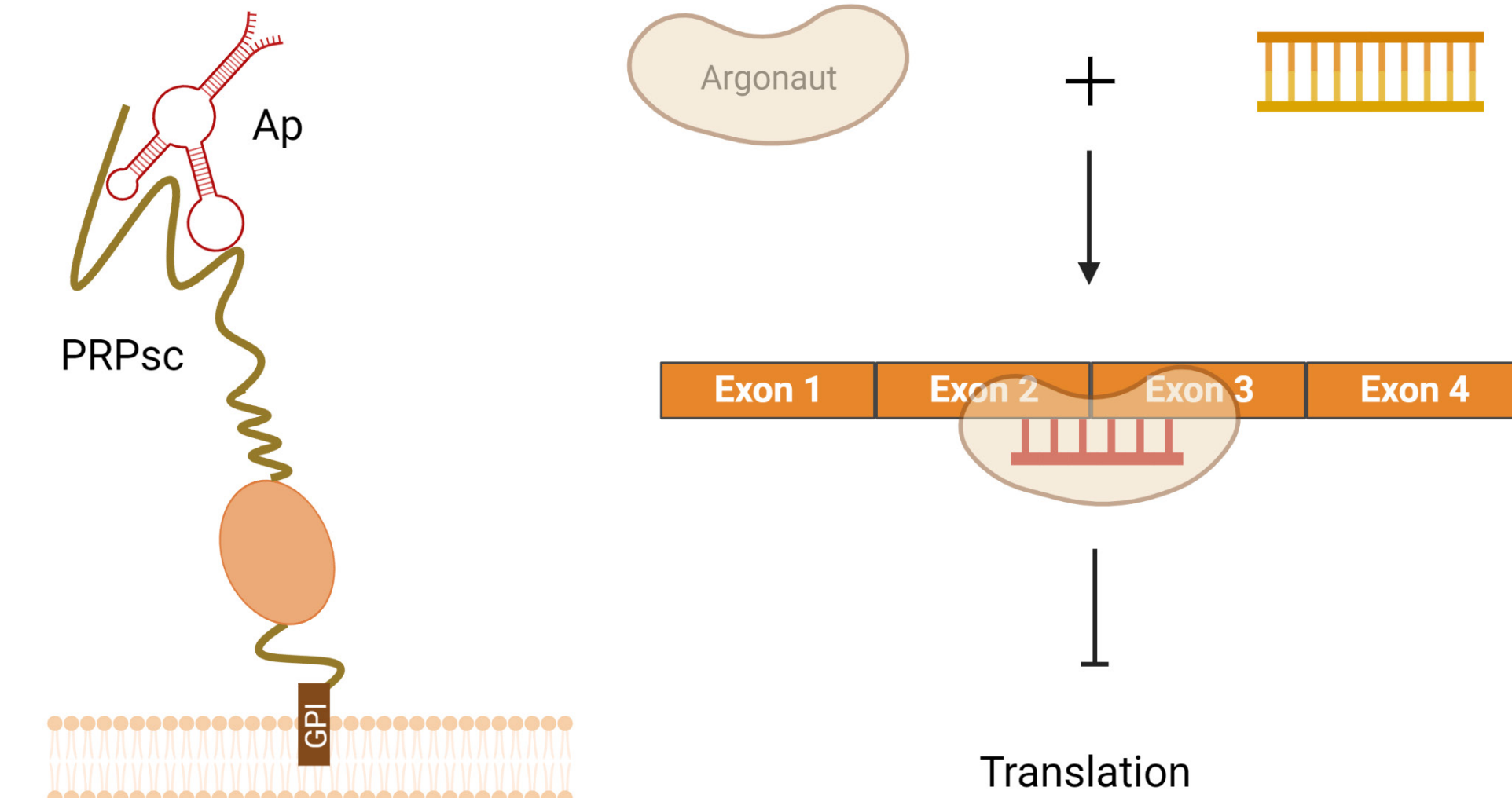


Fig. 3: Venstre: En aptamer binder sig til PrPsc. Højre: siRNA indgår i RISC med Argonauto og blokerer translationen af mRNAet.

## Endelig håb forude - vores behandling!

Da prionproteinerne risikerer at blive smittet, så længe der findes misfoldede prionproteiner i hjernen, er vores behandlingsplan todelt. Den ene del af behandlingen fokuserer på at nedbryde alle prionproteiner en enkelt gang - så man nedbryder alt PrPsc, mens den anden del fokuserer på udelukkende at producere "raske" prionproteiner fremover. Sådan sørger vi for at alle prionproteiner efter behandling er raske. Begge trin i behandlingen skal administreres intravenøst.

### Trin 1

Grundet PrPs' resistens imod flere naturligt forekommende proteaser i mennesket, betyder det, at man ved infektion eller misfoldning, ikke kan nedbryde de patogene proteiner (8, 9). Dette har medført, at man har ledt efter enzymatiske måder at nedbryde PrPsc på, da man ikke kan behandle det kemisk i kroppen. Her er der en undersøgelse der har fundet frem til 6 bakteriestammer, som skaber proteaser, der kan nedbryde PrPsc ved 30 grader celsius og pH på 8 (10). Ud over det, er specifikke proteaser allerede godkendt af FDA, til at de kan administreres ved behandlingsforløb (11). Derfor ville der være mulighed for at oprense proteaserne fra bakterierne, og administrere dem til hjernen. Ved blokkering af PrP gen, håbes der så, at man over en længere periode ville være i stand til at nedbryde alt PrPsc tilstede i hjernemassen.

### Trin 2

Da neuronerne fortsat har brug for PrPc efter vores nedbrydelse af dem alle, betyder det, at vi ikke kan lave knockout på alle prionproteiner, men kun PrPsc uden at påvirke RNA fra det raske kromosom. For at kunne gøre dette, har vi brug for at kunne målrette vores behandling mod RNA der producerer PrPc som er tilbøjelig til at omdannes til PrPsc. Til dette ville vi kunne bruge siRNA, som kan genkende specifikke sekvenser, der er til stede ved mutationer i genet for PrP, dette gen hedder PRNP (12). Da vi kender 9 ofte mutationer relateret til fCJD, ville vi kunne målrette behandling mod disse. Ved udvikling af siRNA, betyder det så, at vi skal skabe dobbeltstrengt RNA, hvor den ene streng er komplementær til den muterede sekvens. Derefter vil argonauto proteiner spalte det dobbeltstrengede RNA til siRNA og indgå i RISC (6). Dette kompleks gør så, at mRNA ikke kan udtrykkes i cellen. Ved kun at targette de muterede sekvenser skulle vi gerne se, at der kun vil blive produceret raske PrP i hjernen fremover.

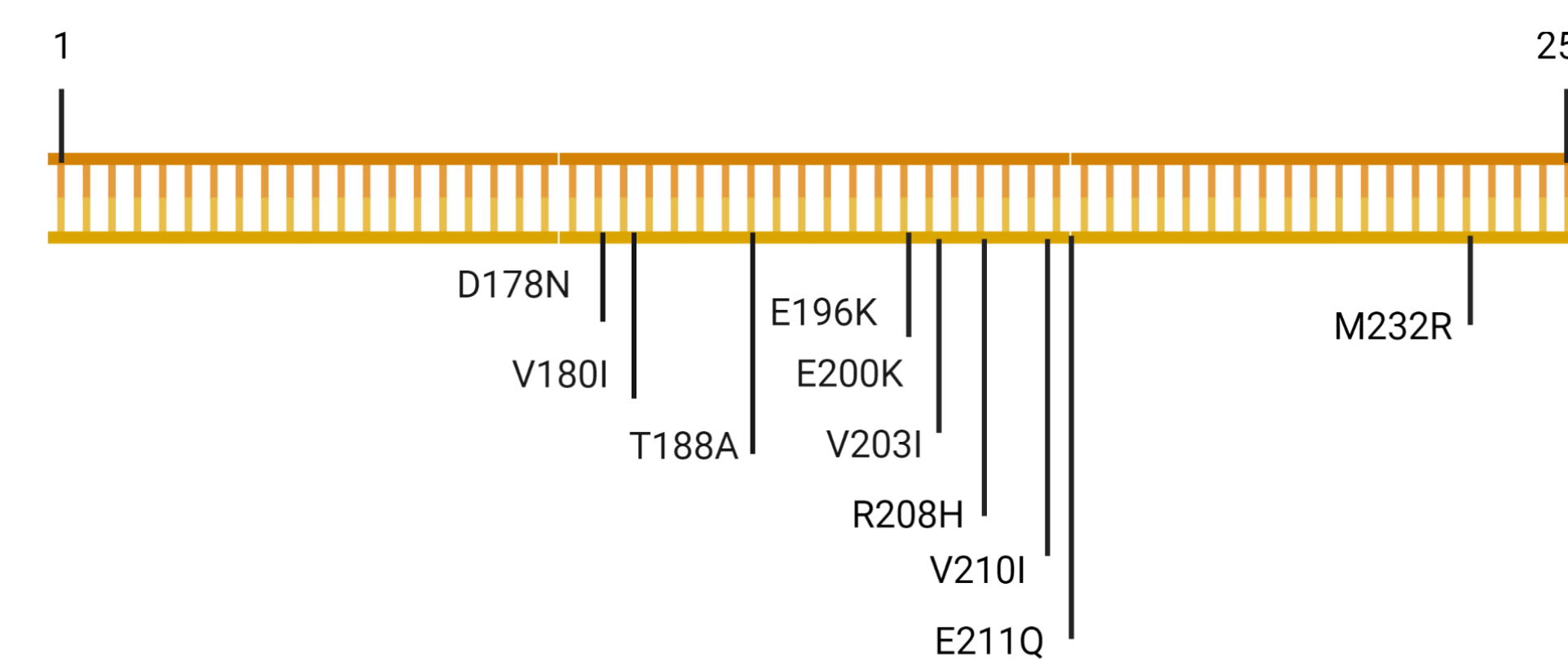


Fig. 5: Mutationerne, der mistænkes at forårsage fCJD (12). Lavet i Biorender.com

## Det må da give nogle udfordringer?

Når vores behandling skal godkendes, kan et problem være, at behandlingen øger risikoen for at få kræft signifikant, da manglen på PrP nedregulerer p53 (16). Dog vil vi argumentere for, at man idag kan behandle kræft langt mere effektivt end CJD, samt at overlevelseshraten og levetiden for folk med kræft er længere end for folk med CJD. De kræfttyper der er størst risiko for at udvikle, er hjernetumorer og livmoderhalskræft. I tilfælde af livmoderhalskræft, kan livmoderen fjernes kirurgisk. Ved hjernetumorer kan man bruge kemo, kirurgi og strålebehandling. Overlevelseshypotesen (5-år) for hjernetumorer i Danmark er 67% for mænd og 82% for kvinder (17), hvor den forventede levetid for folk der udvikler CJD er <2 år (4).

Derudover kan administrering af siRNAet blive en udfordring, da dette skal administreres ofte for at holde undertrykkelsen af det muterede gen ved lige. Dette er fordi siRNAet ligesom alt andet har en begrænset levetid i kroppen. Hvis vi kunne få kroppen til selv at producere siRNAet ville dette problem være løst, men det rejser diverse etiske spørgsmål og ville være langt sværere at få godkendt. En mulighed for dette ville være gennem høj eksponering for en viral behandling (18). Vi forventer at behandlingen skal tages en gang om måneden.

Til sidst kræver vores behandling også en relativt tidlig diagnosticering af CJD, så vi når at nedbryde de smittende prioner inden de skaber uhelelig skade på hjernen. Nye diagnosticeringsmetoder som rt-QuIC, kan dog være et vigtigt element, og da vores behandling er til en arvelig sygdom vil genetiske prøver af efterkommere af fCJD patienter kunne give en god indikation af hvilke individer skal overvåges med henblik på ekstra tidlig behandling.

## Men hvad med BBB?

Vores behandling kræver administrering af flere siRNA-molekyler, som alle skal krydse blod-hjerne barrieren. Vi kan ikke bruge virale vektorer, da man kan udvikle immunitet imod disse og vi ønsker at administrere siRNAet flere gange (13). Derfor bruger vi i stedet et transportmolekyle. Her har vi valgt at bruge phi29, som er en RNA-motor produceret af bakteriofager. Grundet phi29's struktur, er man i stand til at binde 6 grupper på RNA-et. Her ville man så kunne binde 2 phi29'er til hinanden, hvilket giver mulighed for at binde 10 grupper på den overordnede struktur. For at krydse blod-hjerne barrieren, har man brug for at en af sidekæderne er en blod-hjerne barriere receptor specifik aptamer. Ud over det, kan de resterende 9 grupper, så være de 9 siRNA'er der skal bruges til behandling. Studier viser også at phi29 ikke interagerer med siRNA's bindingsaffinitet til target, hvilket betyder at der ikke skal bruges store mængder af komplekset ved dosering. Strukturen skal have en størrelse på ca. 10-100nm, for at det effektivt kan krydse blod-hjerne barrieren. Et phi29 monomer kompleks kan ligge mellem 20-40nm, og da vores er en dimer kan vi gå ud fra at den vil have ca. den dobbelte størrelse. Vi regner derfor ikke med at størrelsen på komplekset bliver et problem (13, 14).

For at få proteasen til nedbrydning af PrPsc igennem blod-hjerne barrieren konjugerer vi dette med et transportprotein, dette kunne være fra OATP familien af proteiner (15).

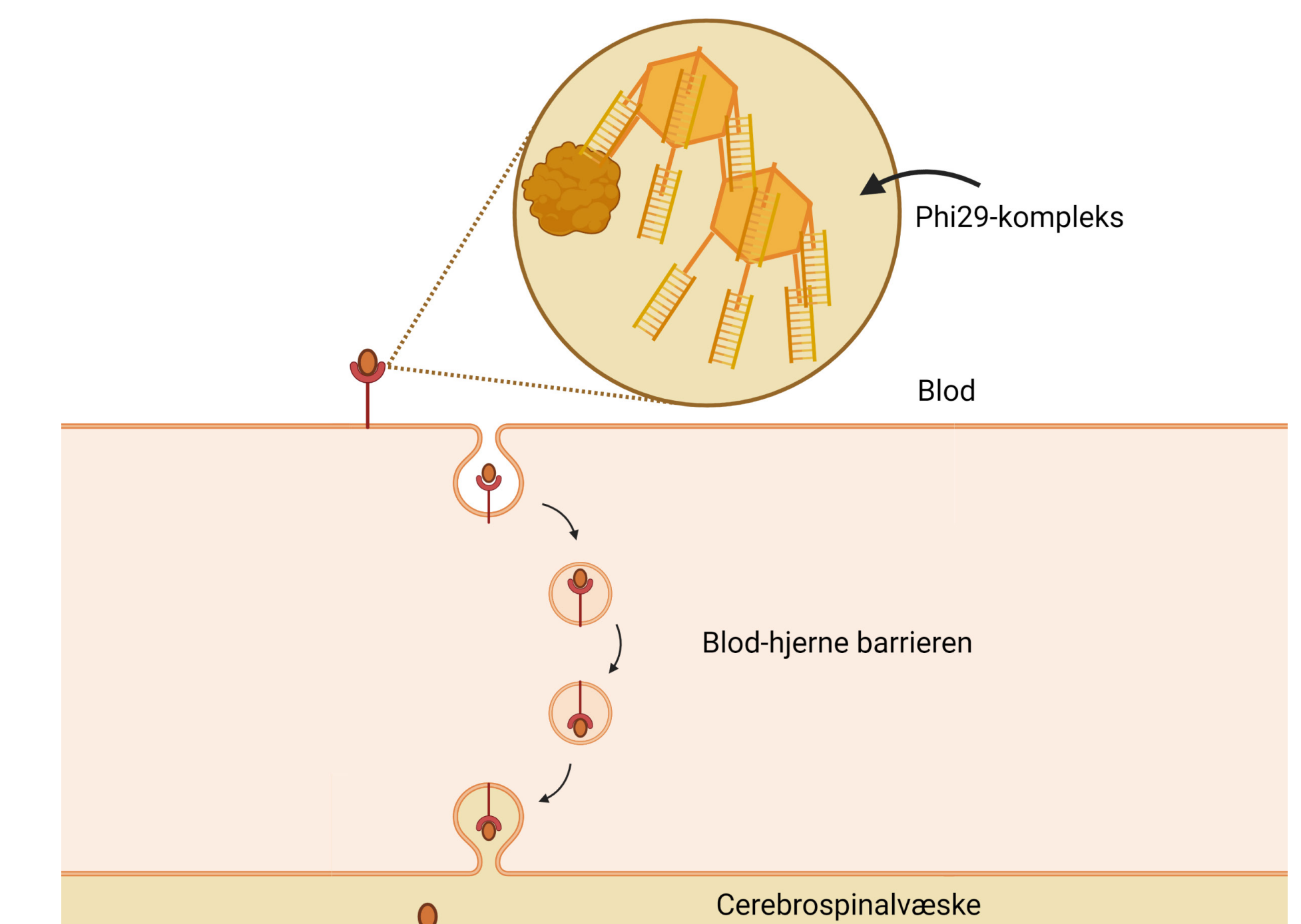


Fig. 6: Phi29-komplekset bringer siRNAet gennem BBB. Lavet i Biorender.com af gruppen.