

Project GPS: Geïnduceerde Pluripotente Stamcellen in de strijd tegen ALS

Philip Van Damme
Dienst Neurologie UZ Leuven,
Labo Neurobiologie KU Leuven
Vesalius Research Center, VIB, Leuven
Herestraat 49, 3000 Leuven, Belgium

Samenvatting van het onderzoeksproject

Amyotrofische laterale sclerose (ALS) is een neurodegeneratieve aandoening die in de eerste plaats het motorisch systeem treft^{1,2}. Er bestaan geen afdoende behandelingen voor deze ziekte, in belangrijke mate omdat de mechanismen die leiden tot het afsterven van motorische zenuwcellen onvoldoende gekend zijn. Tot voor kort waren transgene diermodellen het belangrijkste modelsysteem om de mechanismen van neurodegeneratie te bestuderen. De geïnduceerde pluripotente stamcel (GPS, in het Engels spreekt men van 'induced pluripotent stem cell' of iPSC) technologie stelt ons in staat om vanuit lichaamscellen van ALS patiënten, zoals bindweefselcellen uit de huid, menselijke stamcellen te genereren³. GPS kunnen worden gedifferentieerd in verschillende celtypes waaronder motorneuronen, het celttype dat afsterft in ALS. Hierdoor kunnen menselijke motorneuronen bestudeerd worden van ALS patiënten, iets wat tot voor kort ondenkbaar was.

Deze nieuwe technologie heeft een groot potentieel om nieuwe ziekte inzichten te verwerven. Bovendien kunnen niet alleen motorische zenuwcellen van patiënten met gekende erfelijke oorzaak bestudeerd worden, maar ook van patiënten met sporadische ALS, bij wie de oorzaak van de ziekte onbekend is.

Het doel van dit project is om GPS-cellen te maken van zoveel mogelijk patiënten met ALS en van controlepersonen. Deze worden dan omgevormd tot motorneuronen met als doel ziektemechanismen te identificeren. Een betere kennis over wat precies fout loopt in motorneuronen van patiënten met ALS is onontbeerlijk om nieuwe behandelingen te ontwikkelen. De experimenten gebeuren in samenwerking met Prof. C. Verfaillie van het Stamcelinstituut KU Leuven.

Waarom is het belangrijk om Geïnduceerde Pluripotente Stamcellen te maken?

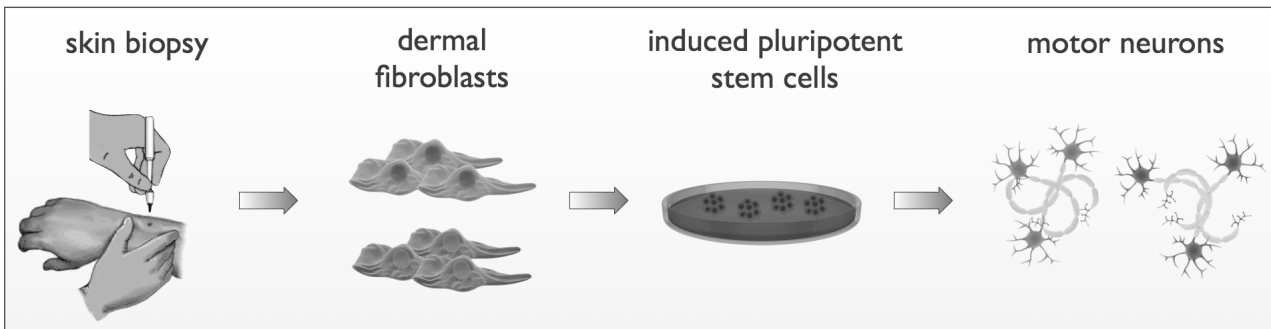
Tot voor kort was het onmogelijk om menselijke motorneuronen van patiënten die ALS ontwikkelen te bestuderen. Dankzij de GPS technologie kunnen we dit wel. Deze stamcellen kunnen gemaakt worden zowel van patiënten met de erfelijke vorm van ALS, als van patiënten met sporadische ALS. Op die manier kunnen ziektemechanismen bestudeerd worden in het juiste celttype, dat bovendien afkomstig is van de zieke patiënt. In eerste instantie is dit belangrijk om het ontstaan van de ziekte beter te kunnen begrijpen, maar deze cellen kunnen ook gebruikt worden om nieuwe behandelingen op uit te testen.

Hoe maken we Geïnduceerde Pluripotente Stamcellen?

Gebruik makende van Sendai virus partikels worden 4 belangrijke stamcellfactoren (SSEA4, TRA-160, OCT4 and NANOG) tijdelijk in de bindweefselcellen gebracht. Deze factoren zorgen voor een herprogrammering van bindweefselcel tot stamcel. Om zeker te zijn dat de herprogrammering geen aanleiding tot chromosomale veranderingen heeft gegeven ondergaan de cellen een DNA profiling (met Array CGH of 'comparative genome hybridisation'). Indien ze de kwaliteitstesten doorstaan worden ze opgekweekt en gebruikt in verdere experimenten.

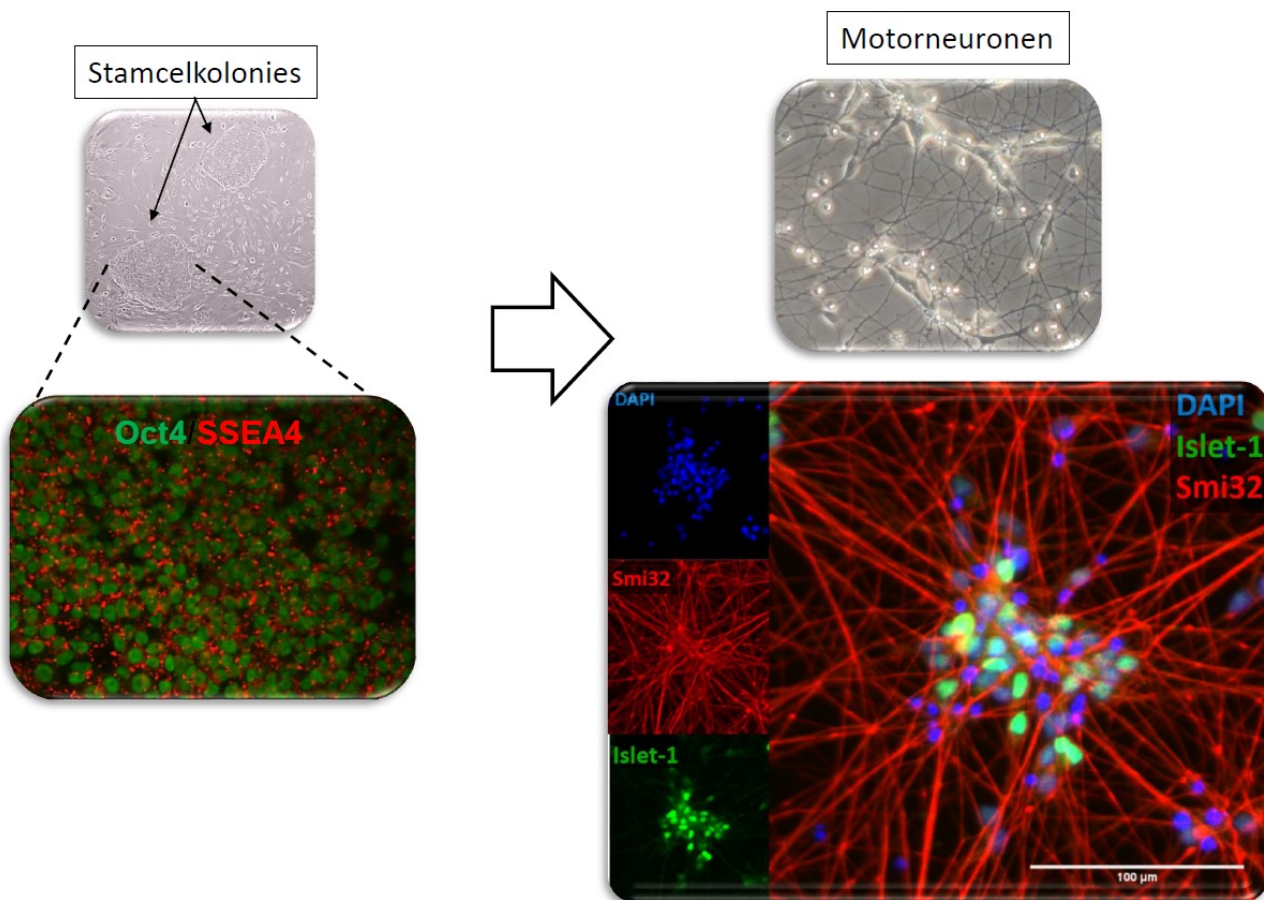
Ter controle zullen ook stamcellen uit bindweefselcellen van gezonde personen gebruikt worden. Een tweede soort controle zijn genetisch gecorrigeerde cellen van patiënten met een gekende erfelijke oorzaak. In de cellijnen van patiënten met een mutatie in het *SOD1*, *TARDBP*, *FUS* of *C9orf72* gen zal de oorzakelijke mutatie verwijderd worden aan de hand van CRISPR/Cas9 technologie. Een vergelijkende studie met de genetisch gecorrigeerde cellen (men spreekt van isogene controles) zijn van grote waarde, omdat enkel de ziekteverwekkende mutatie verschillend is tussen de patiënten cellijn en de controle, terwijl de rest van het

genoom identiek is. Dit laat dus toe om heel specifiek het effect van de ziekteverwekkende mutatie te bestuderen. De werkwijze is hieronder schematisch weergegeven.



Hoe kunnen deze stamcellen omgevormd worden tot motorneuronen?

Om de stamcellen om te vormen tot motorneuronen wordt een differentiatieprotocol gevolgd^{4;5}. De stamcellen worden eerst gedifferentieerd tot een zenuw voorloper cel. Deze worden overgebracht in 96-well platen en verder omgevormd tot motorneuronen. Om aan te tonen dat mature motorneuronen bekomen worden zullen typische motorneuronmerkers gemeten worden (ISL1, HB9, PHOX2B, FOXP1, NF, ChAT) en zal de elektrische activiteit van de zenuwcellen bepaald worden. Onderstaande foto's tonen een voorbeeld van de stamcellen en hoe deze cellen er uitzien na differentiatie tot motorneuronen. De stamcellen zijn kleine ronde cellen in rood en groen (Oct4 in groen en SSEA4 in rood); de gedifferentieerde motorneuronen hebben lange uitlopers en bevatten de motorneuroniwitten zoals Islet-1 (in groen, in de celkern) en de zenuwcelmarker Smi32 (in rood, in de zenuwuitlopers).



Hoe kunnen we menselijke motorneuronen gebruiken om ziekte inzichten te verwerven?

Verschillende studies hebben reeds aangetoond dat motorneuronen van ALS patiënten een verstoorde functie vertonen, die van belang is bij het ontwikkelen van ALS⁶. In eerste instantie zal gekeken worden of er verschillen in genexpressie zijn tussen de motorneuronen van ALS patiënten en controles. Dit gebeurt aan de hand van een transcriptoomanalyse en laat toe om parallel de expressie van alle genen tegelijkertijd te meten. Daarnaast zullen de motorneuronen van ALS patiënten een belangrijk middel zijn om allerhande ziektemechanismen in detail te bestuderen en voor vele jaren een heel belangrijke bron van informatie vormen in de strijd tegen ALS.

Werkplan en kostenplaatje

Het doel van dit project is om GPS cellijnen te maken van ALS patiënten en controles. Het maken en karakteriseren van deze cellen vereist de nodige expertise, is arbeidsintensief en duur.

Het is de bedoeling lijnen te genereren van:

- 5 ALS patiënten met een *SOD1* mutatie
- 5 ALS patiënten met een *TARDBP* mutatie
- 5 ALS patiënten met een *FUS* mutatie
- 5 ALS patiënten met een *C9orf72* mutatie
- 20 genetisch gecorrigeerde lijnen van de bovenstaande patiënten
- 10 ALS patiënten met sporadische ALS, zonder mutatie in de vier belangrijkste ALS genen
- 5 gezonde controlepersonen

De eerste cellijnen worden reeds gemaakt en het doel is om dit tegen eind 2016 af te ronden. De genetische correctie is technisch zeer moeilijk en zal wellicht meer tijd in beslag nemen.

De kostprijs voor herprogrammering van bindweefselcellen tot stamcellen kost ongeveer €7000 per cellijn.

Het corrigeren van een genmutatie ongeveer €15000. De kosten voor differentiatie naar motorische zenuwcellen zijn €2000 en voor transcriptoomanalyse ongeveer €3000.

Referenties

1. Van Damme, P., and Robberecht, W. (2009). Recent advances in motor neuron disease. *Curr Opin Neurol* 22, 486-492.
2. Van Damme, P., and Robberecht, W. (2013). Clinical implications of recent breakthroughs in amyotrophic lateral sclerosis. *Curr Opin Neurol* 26, 466-472.
3. Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* 126, 663-676.
4. Hu, B.Y., and Zhang, S.C. (2009). Differentiation of spinal motor neurons from pluripotent human stem cells. *Nat Protoc* 4, 1295-1304.
5. Maury, Y., Come, J., Piskorowski, R.A., Salah-Mohellibi, N., Chevaleyre, V., Peschanski, M., Martinat, C., and Nedelec, S. (2015). Combinatorial analysis of developmental cues efficiently converts human pluripotent stem cells into multiple neuronal subtypes. *Nat Biotechnol* 33, 89-96.
6. Matus, S., Medinas, D.B., and Hetz, C. (2014). Common ground: stem cell approaches find shared pathways underlying ALS. *Cell stem cell* 14, 697-699.