

Nederlandse samenvatting proefschrift Oliver Härschnitz

iPSC-derived insights into Motor Neuron Disease and Inflammatory Neuropathies

Oliver Härschnitz, 15 september 2017, UMC Utrecht

Stamcellen zijn in staat tot het veranderen, oftewel differentiëren, in andere celtypen. Pluripotente stamcellen hebben de mogelijkheid om tot ieder somatische celtype te differentiëren. Dit biedt eindeloze mogelijkheden bij het onderzoeken van ziekten waarbij het betrokken celtype zelf moeilijk te verkrijgen is, zoals de motorische zenuwcel bij de mens. Met de recente ontdekking van ‘induced pluripotent stem cells (iPSCs)’, cellen die kunstmatig een pluripotent karakter hebben verkregen, is het mogelijk om van humane ziekte modellen te ontwikkelen in het laboratorium (*in vitro*).

‘Cellular reprogramming’ (ook wel het herprogrammeren van cellen) is het onderzoeksveld waarin wordt onderzocht hoe somatische cellen een pluripotent karakter kunnen aannemen. Zo werd tien jaar geleden ontdekt dat door een aantal transcriptiefactoren, namelijk *OCT4*, *SOX2*, *KLF4* en *c-MYC*, tot overexpressie te brengen in huidcellen deze veranderden in stamcellen. Deze stamcellen werden iPSCs genoemd, ook wel geïnduceerde stamcellen. Hiermee was het voor het eerst mogelijk om van patiënten huidcellen af te nemen, stamcellen te maken, en vervolgens ieder celtype naar wens te differentiëren en in het laboratorium te onderzoeken. Het toepassen van deze techniek om ziektemodellen te ontwikkelen en deze te bestuderen heet ‘iPSC-based disease modelling’. Een van de grootste doorbraken van ‘iPSC-based disease modelling’ is dat het nu voor het eerst mogelijk is om humane modellen te ontwikkelen in het laboratorium, waardoor resultaten wellicht beter te vertalen zijn naar de patiënt zelf (in tegenstelling tot bij het gebruik van bijvoorbeeld diermodellen). Deze technieken, ‘cellular reprogramming’ en ‘directed differentiation’, worden in dit proefschrift toegepast om meer inzicht te verkrijgen in de onderliggende ziektemechanismen van de neuromusculaire ziekten amyotrofische laterale sclerose (ALS), multifocale motorische neuropathie (MMN) en progressieve spinale spieratrofie (PSMA).

In het eerste deel hebben we 'iPSC-based disease modelling' gebruikt om de ziekteprocessen te onderzoeken die een rol spelen bij ALS. ALS is een ernstige neurodegeneratieve ziekte waarbij patiënten progressief verlamd raken en gemiddeld na ongeveer 3 jaar na het ontstaan van de eerste klachten komen te overlijden. Ieder jaar ontwikkelen enkele honderden mensen in Nederland ALS. Hoewel we weten dat de progressieve toename van spierzwakte ontstaat door het afsterven van motorische zenuwcellen, is het nog niet duidelijk waarom juist deze cellen bij ALS patiënten zijn aangedaan of hoe het ziekteproces begint in deze cellen. Een klein deel van ALS patiënten (ongeveer 10%) heeft een erfelijke vorm waarbij de ziekte duidelijk in de familie voorkomt (familiaire ALS), echter bij de overige patiënten is er sprake van sporadische ALS. In het geval van familiale ALS kan er een genetische oorzaak, of mutatie, worden aangewezen van de ziekte. Bij sporadische ALS is er waarschijnlijk sprake van een complexe ziekte, waarbij genetische risicofactoren samen met omgevingsfactoren leiden tot het afsterven van motorische zenuwcellen.

Een van deze risicofactoren die een verhoogd risico op het ontwikkelen van ALS geeft is *ATXN2*. Wanneer mensen een toename hebben van het aantal glutamine herhalingen in het *ATXN2* gen kan er een verhoogd risico ontstaan op het ontwikkelen van neurodegeneratieve ziekten, waaronder ook ALS. **Hoofdstuk 2** is een literatuuroverzicht waarin we de normale biologische functie van het Ataxin-2 eiwit beschrijven, en kijken hoe mutaties in *ATXN2* zouden kunnen leiden tot degeneratie van motorische zenuwcellen. We beschrijven een aantal bekende functies van Ataxin-2 als RNA-bindend eiwit, maar ook minder bekende functies zoals de regulatie van celmetabolisme.

Om de bijdrage en rol van *ATXN2* binnen het ziekteproces van ALS verder te onderzoeken hebben we in **hoofdstuk 3** een *ATXN2*-ALS iPSC model ontwikkeld door van ALS patiënten met een *ATXN2* mutatie huidcellen te nemen, hier geïnduceerde stamcellen van te maken, en vervolgens deze te differentiëren tot motorische zenuwcellen. Uit onze studie van dit *ATXN2*-ALS ziektemodel bleek dat motorische zenuwcellen van *ATXN2*-ALS patiënten tekenen van degeneratie laten zien *in vitro* en een ander gen- en eiwitexpressie profiel hebben ten opzichte van motorische zenuwcellen van gezonde mensen. Uit de gen- en eiwitexpressie data bleken er aanwijzingen te zijn voor metabole disfunctie

in *ATXN2*-ALS motorische zenuwcellen, wat we met aanvullende experimenten konden bevestigen. Deze studie laat voor het eerst mogelijke mechanismen zien op basis waarvan mutaties in *ATXN2* zouden kunnen leiden tot celdood van motorische zenuwen. Aanvullende studies met genetische modificatie van iPSC-lijnen zullen deze resultaten moeten bevestigen.

In het tweede deel van deze thesis gebruiken we iPSC-modellen om meer inzicht te verkrijgen in de ziektemechanismen van immuungemedieerde ziekten van de motorische zenuwcellen. In **hoofdstuk 4** bespreken we de aspecten van MMN in een uitgebreid literatuuroverzicht. MMN is een immuungemedieerde ziekte waarbij antilichamen (IgM anti-GM1 antilichamen) gericht tegen motorische zenuwcellen aanwezig zijn. Lang is gedacht dat deze antilichamen pathogeen (schadelijk) zouden zijn voor motorische zenuwcellen, maar mede door het gebrek aan bruikbare ziektemodellen is dit nooit eerder aangetoond. In **hoofdstuk 5** laten we voor het eerst zien dat iPSC-gedifferentieerde motorische zenuwcellen als humaan ziektemodel kunnen dienen voor een inflammatoire zenuwziekte als MMN, en dat de eerder beschreven antilichamen inderdaad schadelijk zijn voor motorische maar niet voor sensorische zenuwcellen. Onze data wijzen verder op meerdere mechanismen die tot schade zouden kunnen lijden bij motorische zenuwcellen. Tot slot hebben we laten zien dat dit model toepassingen kan hebben om therapieën te testen, bijvoorbeeld door te laten zien dat de huidige therapie schadelijke effecten (grotendeels) kan voorkomen.

Dat het ontrafelen van de onderliggende ziektemechanismen zeer complex kan zijn blijkt uit de laatste aandoening die we hebben bestudeerd, PSMA. Lang is gedacht dat dit een puur degeneratieve aandoening was, waarbij net zoals bij ALS een versnelde ouderdom van motorische zenuwcellen leidt tot vervroegde celdood en verlamming. Recente studies hebben echter aangetoond dat er wellicht een subpopulatie van patiënten is die een immuungemedieerde ontstaansmechanisme hebben. Derhalve hebben we in **hoofdstuk 6** getracht te kijken of er patiënten waren die antilichamen tegen motorische zenuwcellen hebben, vergelijkbaar met MMN patiënten. Door stamcel-gedifferentieerde motorische zenuwcellen te incuberen met het serum van patiënten hebben we in deze studie kunnen aantonen dat er twee onafhankelijke subpopulaties zijn van PSMA-

patiënten met antilichamen die binden aan motorische zenuwcellen. De eerste groep heeft dezelfde antilichamen die ook centraal staan in het ziekteproces bij MMN patiënten, namelijk IgM anti-GM1 antilichamen. De tweede groep heeft een nog nader te specificeren antilichaam. Verder onderzoek zal het epitoom moeten identificeren waartegen dit antilichaam is gericht.

Tot slot hebben we in **hoofdstuk 7** iPSC-gedifferentieerde zenuwcellen gecombineerd met een tweede techniek, namelijk synthetische beads gevolgd door flow cytometrie, om zo te kijken of we betrouwbaar IgM anti-GM1 antilichamen konden detecteren in het serum van MMN-patiënten. De huidige technieken (zoals ELISA en glycoarrays) hebben een beperkte sensitiviteit en specificiteit, waardoor anti-GM1 antilichamen maar een beperkte waarde hebben in de kliniek als biomarker. We hebben in onze experimenten laten zien dat door iPSC-gedifferentieerde zenuwcellen te combineren met synthetische beads we deze anti-GM1 antilichamen robuust kunnen identificeren. Een vervolgstudie zal nodig zijn om de sensitiviteit en specificiteit van deze assays te vergelijken met die van andere assays, zoals de ELISA en glycoarray.

Hoofdstuk 8 vat de resultaten uit dit proefschrift samen in een algemene discussie, en plaatsen deze bevindingen in de bredere context van ‘iPSC-based disease modelling’. Ten slotte kijk ik welke mogelijkheden en uitdagingen er in de toekomst liggen voor het gebruiken van deze modellen voor verdere onderzoek naar neuromusculaire aandoeningen zoals ALS, MMN en PSMA.

Het onderzoek zoals in dit proefschrift beschreven is grotendeels tot stand gekomen door het gebruik van geïnduceerde stamcellen en de differentiatie hiervan tot verschillende typen zenuwcellen. Door het ontwikkelen van iPSC-gebaseerde humane ziektemodellen voor zowel *ATXN2*-ALS als MMN hebben we nieuwe inzichten verkregen in de ziekteprocessen die leiden tot degeneratie en dysfunctie van motorische zenuwcellen. De ontwikkeling van deze modellen zal in de toekomst een bijdrage leveren voor verdere studies aan zowel ALS als MMN. Met het identificeren van een subpopulatie van PSMA-patiënten met een immuungemedieerde ziektemechanisme hebben we een stap gezet in het ontrafelen van deze heterogene patiëntenpopulatie. Dit is belangrijk, want

wellicht komt deze patiëntenpopulatie in de toekomst in aanmerking voor immuuntherapie. 'iPSC-based disease modelling' is een jong onderzoeksveld die pas tien jaar bestaat, en de toekomst zal uitwijzen wat de bijdrage van dergelijke modellen zal zijn voor patiënten. Daarnaast is het van groot belang om te realiseren dat ieder model beperkingen heeft, en de vraag blijft of we de complexiteit van een compleet organisme ooit *in vitro* kunnen nabootsen. Desalniettemin biedt 'iPSC-based disease modelling' veel hoop op nieuwe ontdekkingen en daarmee nieuwe therapieën voor patiënten met onbehandelbare dan wel moeilijke behandelbare ziekten.