Geïnduceerde pluripotente stamcellen als model voor wetenschappelijk onderzoek aan neurodegeneratieve ziektes

Bachelorscriptie

Auteur: ***Tim Schut***

Begeleider: ***Dr. H. H. Kampinga***

Datum: ***02-07-2013***

Abstract

Neurodegeneratieve ziektes zijn ernstige aandoeningen die leiden tot motorische en psychische stoornissen en uiteindelijk tot het overlijden van de patiënt. Het is nog niet bekend hoe dergelijke ziektes precies werken waardoor er nog veel onderzoek nodig is. Het onderzoek is echter afhankelijk van kunstmatige cel- en diermodellen of van *post mortem* hersenmateriaal. In 2006 was er een doorbraak waarbij het onderzoekers is gelukt om somatische cellen te herprogrammeren naar een stamcelstadium. Deze geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) kunnen worden gedifferentieerd naar elke willekeurige cel uit de drie kiemlagen. Hiermee kunnen ook neuronen worden gemaakt, wat een nieuw model voor onderzoek biedt. De voordelen van het gebruik van iPSC zijn: de toegang tot gezonde neuronen, waarbij de genetische achtergrond van de patiënt wordt meegenomen; het vergelijken van verschillende celtypes met dezelfde genetische achtergrond; het bieden van een nieuw onderzoeksmodel voor bepaalde ziektes; en het is ethisch verantwoord. In de toekomst kunnen er nog meer celtypes vergeleken worden, er kan onderzocht worden mechanismen die de ziektes opwekken, en er zou gedacht kunnen worden aan eventuele cel-vervangende therapieën.

Inhoudsopgave

4 Inleiding

4 Induced pluripotent stem cells

8 Differentiatie van induced pluripotent stem cells

8 Neurodegeneratieve ziektes en geïnduceerde pluripotente stamcellen

12 Perspectief

14 Conclusie

14 Referenties

Inleiding

Neurodegeneratieve ziektes zijn ernstige aandoeningen die wereldwijd veel mensenlevens eist. Onder de neurodegeneratieve ziektes vallen onder andere: de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson, de ziekte van Huntington, Spinocerebellaire ataxie en nog veel meer. Al deze ziektes gaan vaak gepaard met bewegingsstoornissen en dementie. Er zijn nog geen medicijnen of behandelingen om te herstellen van een dergelijke neurodegeneratieve ziekte, er zijn enkel methodes om de ziekte te remmen of om de effecten ervan te verminderen. Echter zullen al deze ziektes toch leiden tot het overleiden van de patiënt. Eén van de hoofdredenen waardoor er nog geen goede behandelmethode is gevonden, komt doordat het erg moeilijk is om goed onderzoek te doen naar deze ziektes. Men kan gebruik maken van *post mortem* hersenmateriaal of kunstmatige cel- en diermodellen. Er zijn echter altijd nadelen aan dit soort modellen, ondanks dat er dankzij deze modellen al enorm veel kennis is verkregen over neurodegeneratieve ziektes.

Een relatief nieuw model, ontdekt in 2006 door Takahashi en Yamanaka, waarbij geïnduceerde pluripotente stamcellen (*induced pluripotent stem cells; iPSC*) worden gebruikt, zou nieuwe mogelijkheden kunnen bieden. Dit zijn patiënt-specifieke cellen die geherprogrammeerd worden tot stamcel. Vanuit deze stamcelstaat kunnen ze worden gedifferentieerd naar neuronen. Op deze manier worden er *in vitro* patiënt-specifieke neuronen verkregen die toegankelijk zijn voor allerlei wetenschappelijk onderzoek. Daarnaast wordt het wetenschappelijk onderzoek niet meer verhinderd door de ethische kwesties wat betreft het gebruik van embryonale stamcellen (ESC). Dit model zou groot belang kunnen hebben bij toekomstig wetenschappelijk onderzoek naar neurodegeneratieve ziektes.[1]

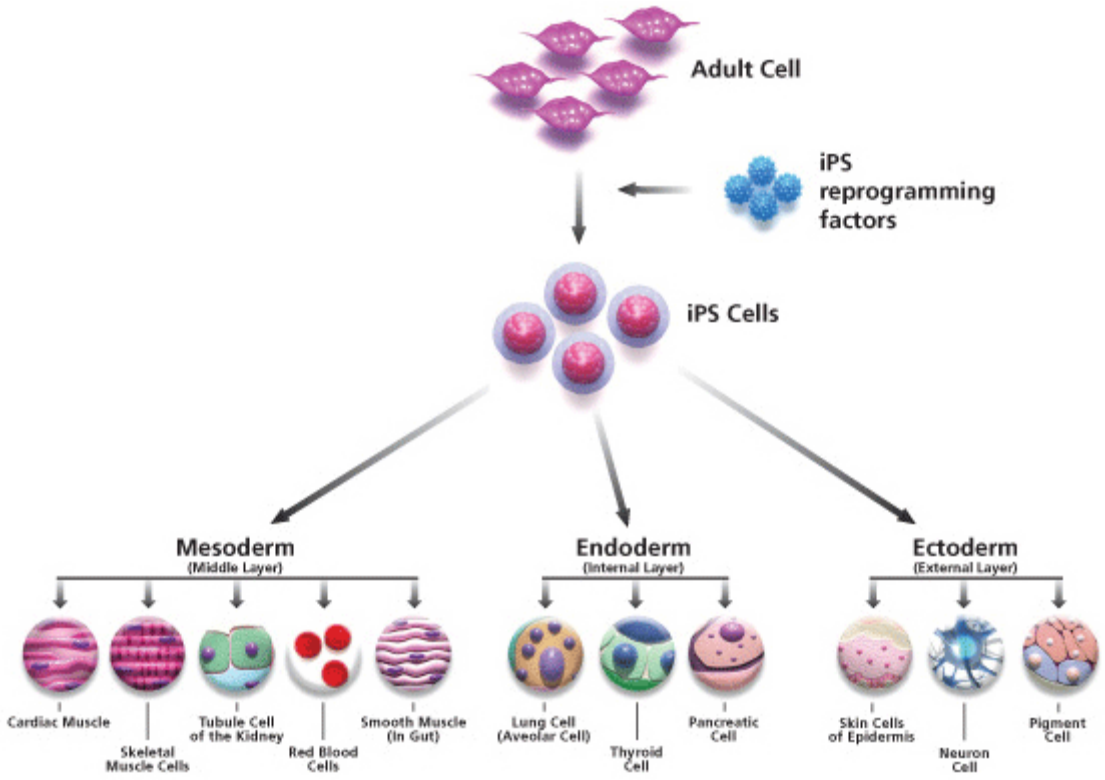
In deze scriptie wordt samengevat wat tot op heden is gedaan met iPSC van patiënten met neurodegeneratieve ziektes en wat voor extra informatie het gebruik van iPSC tot nu toe heeft opgeleverd, en wat de eventuele mogelijkheden voor de toekomst zouden kunnen zijn.

Geïnduceerde pluripotente stamcellen

Geïnduceerde pluripotente stamcellen zijn geherprogrammeerde cellen die pluripotente stamcel eigenschappen hebben. Het feit dat ze pluripotent zijn, betekent dat ze kunnen differentiëren naar alle cellen van de drie oorspronkelijke kiemlagen van een embryo: het ectoderm, het mesoderm en het endoderm, zoals is weergegeven in figuur 1. Elke willekeurige cel zou in principe kunnen worden herprogrammeerd naar iPSC zolang de juiste transcriptiefactoren maar aanwezig zijn. Deze transcriptiefactoren, gevonden door Takahashi en Yamanaka, zijn: *octamer binding transcription factor 3/4* (Oct3/4), *sex determining region Y-box 2* (Sox2), *Krüpel-like factor 4* (Klf4) en *myelocytomatosis oncogene* (c-Myc) [1,2]. Deze transcriptiefactoren zijn overkoepelende factoren die grote stukken van het genoom aan of uit kunnen zetten door middel van het beïnvloeden van de DNA-methylatie en de histonen.[3] Oct3/4, wat oorspronkelijk in de *inner cell mass* van embryos tot expressie komt, blijkt onvervangbaar te zijn voor het verkrijgen van iPSC en beïnvloed genexpressie van genen die betrokken zijn bij *self-renewal* en differentiatie.[4,5] De transcriptiefactoren Sox2, Klf4 en c-Myc komen ook tot expressie in verscheidene weefsels van volwassenen en zouden kunnen worden vervangen door homologen of kleine moleculen. Sox2 is een DNA-bindend eiwit die met gen-*enhancers* bindt.[6] Daarnaast

kan het ook een binding met Oct3/4 aangaan, samen stabiliseren ze het DNA.[7] Klf4 is een transcriptiefactor en reguleert cel proliferatie en differentiatie.[8] Klf4 speelt ook een rol bij de inactivatie van het p53 *tumor suppressor* gen, wat op dienst beurt het homeobox eiwit NANOG onderdrukt. NANOG speelt een grote rol bij *self-renewal*. Klf4 verhoogt hierdoor indirect de expressie van NANOG.[9] c-Myc is een proto-oncogen, speelt een rol bij de cel proliferatie en verhoogt de efficiëntie en snelheid van het herprogrammeren naar iPSC.[10] c-Myc beïnvloed de acetylatie van histonen, men vermoed dat deze modificatie van chromatine de toegang tot de herprogrammerende transcriptiefactoren makkelijker maakt.[11,12]

Het gebruik van deze vier transcriptiefactoren is het meest succesvol gebleken, al kan het soms per initiële celtype verschillen in welke verhouding deze transcriptiefactoren tot elkaar moeten zijn. Daarnaast is het een lang proces en is de effectiviteit van het herprogrammeren erg laag, waardoor er veel cellen moeten worden gebruikt om mee te beginnen, om zo uiteindelijk enkele succesvol geherprogrammeerde iPSC te verkrijgen.[13]



Figuur 1. Overzicht van het herprogrammeringsproces naar iPSC en de mogelijke differentiatie naar elke cel van de drie kiemlagen: mesoderm, endoderm en ectoderm.[14]

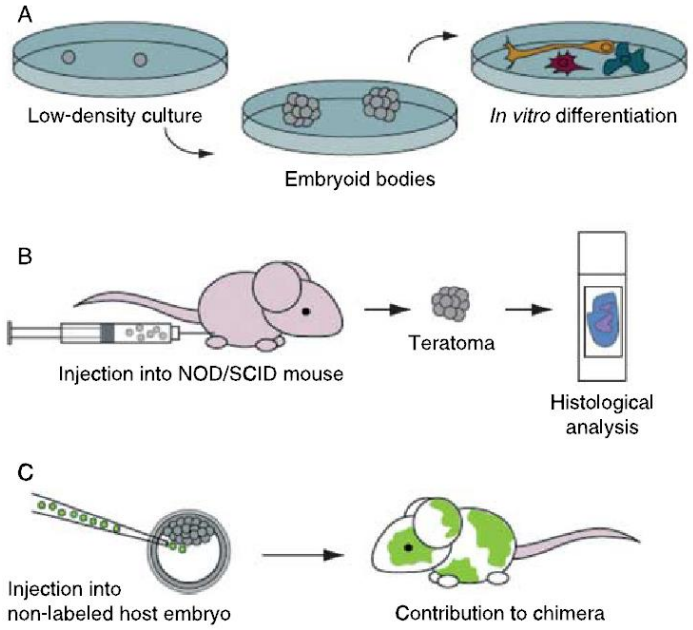
Tabel 1. Methoden voor het inbrengen van transcriptiefactoren voor generatie van iPSC.[15]

Methode	Voordeel	Nadeel
Retrovirus	*Self-silencing*, men hoeft de factor niet actief te verwijderen	Integratie in het genoom Verhoogde kans op tumoren Kan alleen delende cellen infecteren
Lentivirus	Kan zowel delende als niet-delende cellen infecteren Het mRNA kan meerdere genen dragen Expressie kan bestuurd worden met het Tet-systeem Transgen-vrij door middel van CRE/loxP excisie	Integratie in het genoom Kan niet *silencen* in pluripotente staat
Adenovirus	Lage frequentie van integratie in het genoom	Herhaalde transfectie nodig Vetraagde kinetiek van het reprogrammeren Soms generatie van tetraploïde cellen
Episomale vectoren	Lage frequentie van integratie in het genoom	Excisie inefficiënt en kost veel werk
Sendai vectoren	Geen virale componenten Geen integratie in het genoom	Inefficiënt
Transient transfectie	Geen virale componenten Lage frequentie van integratie in het genoom Technisch simpele procedure	Meerdere applicaties nodig Lagere expressie-niveaus Vertraagde kinetiek van het reprogrammeren Integratie in het genoom geeft een voordeel in natuurlijke selectie, hierdoor is *clone screening* nodig
PiggyBac transposon	Precieze verwijdering mogelijk	Extreem lage efficiëntie
Minicircle DNA	Geen virale componenten Geen bacterieel DNA Hoge expressie	Inefficiënt
Synthetisch mRNA, miRNA	Geen virale componenten Geen integratie in het genoom Hoge efficiëntie	Meerdere applicaties nodig
Eiwit transductie	Directe levering van transcriptiefactoren vermijdt complicaties van transfectie Geen virale componenten	Meerdere applicaties nodig Sommige eiwitten moeilijk te purificeren
Kleine moleculen	Geen virale componenten Te controleren activiteit Technisch simpele procedure	Probleem van toxiciteit tegenover efficiëntie Ongedefinieerde/onspecifieke effecten
Nanofectie	Geen virale componenten Te controleren activiteit Technisch simpele procedure	Minder efficiënt dan virale transfectie

Om de transcriptiefactoren in de cel te krijgen kan gebruik worden gemaakt van verschillende methodes (tabel 1). Er kan gebruik worden gemaakt van virale transfectie om de genen voor de transcriptiefactoren in het genoom te integreren, zoals met een retrovirus of lentivirus. Dit is tot dusver de meest efficiënte methode gebleken, ook al is het niet mogelijk precies te controleren waar de genen in het genoom worden geïntegreerd, of in welke mate dit gebeurt. Hierdoor kunnen integraties plaatsvinden midden in andere genen, met alle gevolgen van dien. Naast het integreren in het genoom is het ook mogelijk om genen op een andere manier tot expressie te brengen, met bijvoorbeeld plasmiden of met behulp van een adenovirus. Tot slot is het ook nog mogelijk om niet de genen tot expressie te brengen, maar direct de transcriptiefactoren in te brengen of juist het mRNA van de transcriptiefactoren in te brengen [16]. Het

probleem met deze technieken is echter dat het moeilijk is om precies de juiste concentraties toe te voegen. Daarnaast moet het ook constant gecontroleerd worden, wat het een erg tijdrovend en arbeidsintensief proces maakt.[13]

Na het hele herprogrammeringsproces, dat enkele weken duurt, zullen de stamcellen zichzelf van de juiste transcriptiefactoren voorzien en zo zichzelf blijven vernieuwen. Het is van het grootste belang dat het medium waarin of waarop de iPSC groeien stabiel blijft, slechts lichte schommelingen van buitenaf kunnen de cellen tot differentiatie aanzetten. Ook is het belangrijk om te controleren of de verkregen cellen pluripotent zijn. Eén van de belangrijkste markers voor pluripotentie is de expressie van het *Nanog*-gen. Daarnaast kan op verschillende andere manieren worden gecontroleerd of de verkregen stamcellen ook daadwerkelijk pluripotent zijn, zoals weergegeven in figuur 2. Als het verkrijgen van iPSC succesvol is gebleken, kunnen ze nu gedifferentieerd worden naar een celtype naar keuze.[17]



Figuur 2. Onderzoek naar pluripotentie. (A) iPSC zonder het cytokine *LIF* dat zorgt voor self-renewal zullen embryonale lichamen vormen, geïsoleerde cellen hieruit zullen differentiëren naar cellen van de drie kiemlagen. (B) Injectie van iPSC in een immunodeficiënte muis zullen na 6 tot 8 weken zorgen voor teratomen, die cellen van alle drie kiemlagen bevatten. (C) Gelabelde iPSC ingebracht in een ongelabeld embryo, zullen uiteindelijk terug te vinden zijn in alle drie de kiemlagen van het uiteindelijke organisme.[17]

Differentiatie van geïnduceerde pluripotente stamcellen

Het differentiëren van iPSC naar neuroncellen kan op verschillende manieren gebeuren. De eerste is gebruik maken van *feeder-cells*, dit zijn stromacellen van muizen. Door toevoeging van groeifactoren als *SHH*, *FGF8* en *BDNF* en de tot dusver onbekende factoren afkomstig van de stromacellen differentiëren hierdoor de iPSC naar neurale voorlopercellen. Ten tweede kan zonder *feeder*-cellen gebruik worden gemaakt van een medium die neurale differentiatie induceert, hierin worden dan *neurospheres* gevormd. Deze kunnen worden uitgeplaat op plaatjes die bedekt zijn met *PLO*, waaraan de *neurospheres* plakken en op een gegeven moment *neural rosettes* vormen. De neural rosettes bevatten neurale voorlopercellen. De neurale voorlopercellen kunnen vervolgens nogmaals gedifferentieerd worden naar de uiteindelijke neuronen, met behulp van groeifactoren als bijvoorbeeld *TGF-β*.[18-20] Naast de methode iPSC blijkt het ook mogelijk te zijn om direct uit fibroblasten neuronale voorlopercellen te maken. Dit gebeurt echt wel met een soort herprogrammering die lijkt op het maken van iPSC. De cellen worden dus niet helemaal teruggebracht naar het iPSC stadium, maar voor ze dat stadium bereiken al gedifferentieerd naar neuronale voorlopercellen.[21]

Onder de tot nu toe gedifferentieerde neuronen vallen onder andere: motorneuronen, astrocyten, dopaminerge neuronen, cerebellum neuronen, basale voorbrein cholinerge neuronen en oligodendrocyten. De mogelijkheid om grote hoeveelheden neuronen te genereren biedt mogelijkheden: enerzijds voor eventuele therapeutische toepassingen, zoals cel-vervangende therapieën; anderzijds voor onderzoek. In deze scriptie zal worden uitgelicht wat de toepassingen van iPSC op het gebied van onderzoek naar neurodegeneratieve ziektes zijn.[22]

Neurodegeneratieve ziektes en geïnduceerde pluripotente stamcellen

Neurodegeneratieve ziektes zijn ziektes waarbij grote hoeveelheden neuronen afsterven. Er zijn veel verschillende ziektes waarbij dit gebeurd, zoals de ziekte van Alzheimer, de ziekte van Parkinson, de ziekte van Huntington en spinocerebellaire ataxie. De manier waarop deze ziektes tot expressie komen gebeurt op verschillende manieren en er bestaat nog een grote onduidelijkheid over hoe de ziektes precies werken. Voornamelijk door dit gebrek aan kennis is er nog geen manier gevonden om patiënten van deze ziektes te genezen. Er bestaan enkel nog behandelmethoden die de symptomen kunnen verminderen. Echter ondanks dat de levenskwaliteit van de patiënten enigszins kan worden verbeterd, leiden deze ziektes toch na een traject van psychische en motorische stoornissen nog altijd tot het overlijden van de patiënt. Neurodegeneratieve ziektes zijn, in het geval van een genetische oorzaak, vaak al langere tijd bij de patiënt aanwezig. Er kan echter een behoorlijk verschil zitten tussen twee patiënten met dezelfde aandoening, zowel qua ernst als de leeftijd waarop de ziekte begint te spelen.

Naast een genetische oorzaak (familiair), kunnen neurodegeneratieve ziektes ook spontaan (idiopathisch) optreden. Het feit dat een bepaalde vorm van een ziekte als idiopathisch wordt gezien, sluit niet uit dat deze vorm totaal geen genetische achtergrond kan hebben. Het houdt alleen in dat er op het moment geen genetische achtergrond bekend is. De familiaire vorm van een neurodegeneratieve ziekte is vanzelfsprekend gemakkelijker te onderzoeken dan de idiopathische, het genetische defect is immers al bekend. Dit maakt het des te lastiger om neurodegeneratieve ziektes te onderzoeken,

aangezien van bepaalde ziektes de idiopathische vorm vaker voorkomt dan de familiaire. Dit sluit echter niet uit dat onderzoek naar de familiaire vorm niks kan betekenen voor de idiopathische vorm. De verschillende vormen zouden immers toch via overeenkomende mechanismen kunnen worden veroorzaakt.[22]

Tabel 2. Met behulp van iPSC verkregen modellen van neurodegeneratieve ziektes met een genetische oorzaak.[15,23-25]

Ziekte	Oorzaak ziekte	Verkregen celtype(s)
Adrenoleukodystrofie	Mutatie in *ABCD1*	Oligodendrocyten, neuronen
Amyotrofe laterale sclerose	Mutatie in *SOD1* Mutatie in *VAPB* Mutatie in *TAP-43*	Motorneuronen Motorneuronen Neuronen, motorneuronen
Ataxie van Friedreich / spinocerebellaire ataxie	GAA-herhalingen in *FXN*-gen	Perifere neuronen, cardiomyocyten
Familiaire dysautonomie	Mutatie in *IKBKAP*	Cellen uit de drie kiemlagen, perifere neuronen
Spinale musculaire atrofie	Mutatie in *SMN1*	Neuronale culturen, motorneuronen, astrocyten
Syndroom van Rett	Mutatie in *MECP2*	Neuronvoorlopercellen
Ziekte van Alzheimer	Mutatie in *PS1* en *PS2* Duplicatie van *APP*	Neuronen Neuronen
Ziekte van Huntington	CAG-herhalingen in Huntingtin-gen	Neuronvoorlopercellen, striatale neuronen, astrocyten
Ziekte van Machado-Joseph / spinocerebellaire ataxie type 3	CAG-herhalingen in *MJD1* (*ATXN1*)-gen	Neuronen, fibroblasten, gliacellen
Ziekte van Parkinson	Mutatie in *LRRK2* Mutatie in *PINK1* Mutatie in *SNCA* Mutatie in *PARKIN*	Dopaminerge neuronen Dopaminerge neuronen Dopaminerge neuronen Dopaminerge neuronen

iPSC vormen een betrouwbare bron van patiëtnt-specifieke neuronen, wat erg belangrijk is aangezien het lastig is om neuronen uit een levend persoon te halen en *post mortem* materiaal soms al te ver is aangetast. Ook is men niet meer afhankelijk van embryonale stamcellen (ESC), waardoor men grote ethische kwesties vermijdt. Een nadeel is wel dat het genereren van iPSC redelijk lang duurt, ook kan het inbrengen van de herprogrammeringsfactoren het patiënt-specifieke genoom aantasten (tabel 1) als dit op een verkeerde plek wordt geïntegreerd, al zijn er wel technieken die dit vermijden.

Vereist voor iPSC om als onderzoeksmodel te kunnen functioneren, is ziekte-specificiteit en het ook daadwerkelijk tot uiting brengen van de ziekte die de iPSC dragen. Immers, als de ziekte niet tot expressie komt, worden te mogelijkheden tot onderzoek behoorlijk beperkt. Zoals te zien is in tabel 2, zijn er al vele iPSC ontwikkelt die een neurodegeneratieve ziekte dragen en die daarnaast ook het fenotype van de ziekte tot uiting hebben gebracht. Slechts het tot uiting brengen van de ziekte is voor iPSC al genoeg om als onderzoeksmodel te kunnen functioneren. Men kan namelijk onderzoek doen naar nieuwe, of bestaande, medicijnen of stoffen. Dit wordt gedemonstreerd in een onderzoek van Lee *et al.*, waarbij iPSC van familaire dysautonomie (FD) werden gebruikt. FD is een zeldzame ziekte die sensorische neuronen en neuronen van het autonome zenuwstelsel aantasten door mutaties in het gen voor het *I-k-B kinase complex-associated protein* (IKBKAP), waardoor IKBKAP verkeerd wordt geknipt. iPSC van een patiënt met FD werden gedifferentieerd naar neuronvoorlopercellen die drie ziekte gerelateerde fenotypes tot expressie brachten: een defect in het splitsen van IKBKAP, verlaagde neurogenese en verlaagde migratie. Deze iPSC werden vervolgens behandeld met bepaalde stoffen. Eén van deze stoffen, *kinetin*, bleek de drie ziekte gerelateerde fenotypes gedeeltelijk terug te kunnen draaien.[26]

Het is van groot belang om bij onderzoeksmodellen naar neurodegeneratieve ziektes gebruik te maken van het humane genoom. Het gebruik van dierlijke onderzoeksmodellen volstaat namelijk niet altijd, zoals kan worden aangetoond bij spinale musculaire atrofie (SMA). SMA ontstaat door een verlies van motorneuronen in de ruggenmerg door missende activiteit van het eiwit *survival of motor neuron* (SMN), dankzij een mutatie van het *SMN1*-gen. Het probleem waardoor deze ziekte niet, of moeilijk, te onderzoeken is in diermodellen, komt doordat bij de mens er twee SMN isovormen bestaan: een telomeer- en een centromeerversie. De mens is de enige soort waarbij dit voorkomt, andere diersoorten hebben slechts één vorm van SMN.[27] Het feit dat de dierlijke versies van neurodegeneratieve ziektes kunnen afwijken van de menselijke, houdt in dat er een voorkeur is voor het gebruik van menselijk DNA bij het onderzoek. Er zouden ook tot nu toe nog niet ontdekte factoren in het humane genoom kunnen zitten die een rol spelen bij neurodegeneratieve ziektes. Deze nog niet ontdekte factoren spelen helemaal een grote rol bij het onderzoek naar idiopathische vormen van neurodegeneratieve ziektes. Deze redenen geven weer waarom het gebruik van iPSC, waarmee men het patiënt-specifieke humane genoom kan meenemen, zo belangrijk is.

Een ander voorbeeld waarbij diermodellen niet volstaan is bij de ziekte van Parkinson. Parkinson is een ziekte die zich kenmerkt door een verlies aan neuronen in het centrale zenuwstelsel. Met name de dopaminerge neuronen in de *substantia nigra* sterven af, maar ook neuronen op andere plekken in het brein en in de hersenstam. Dit leidt in de eerste instantie tot motorische stoornissen, maar er kan ook dementie optreden. Daarnaast zijn er ook *Lewy-bodies*, die vaak in *post mortem* onderzoek worden gevonden, maar waarvan nog niet helemaal duidelijk is wat voor rol ze spelen bij deze ziekte. Wel is gevonden dat de *Lewy-bodies* voornamelijk bestaan uit aggregaten van het α-synucleïne eiwit. Parkinson is voor het grootste deel een idiopathische ziekte, slechts een klein percentage van de patiënten heeft parkinson erfelijk gekregen.[18,20,28] Onderzoek naar parkinson blijkt echter nog moeilijk te zijn. Diermodellen volstaan namelijk niet altijd, zoals Jiang *et al.* lieten zien. Ondanks dat ze muizen gebruikte met niet-functioneel Parkin, ontwikkelde de muizen geen fenotype van parkinson. Dit suggereert dat humane dopaminerge neuronen op een unieke manier werken. Een ander voorbeeld komt van Seibler *et*

al., zij onderzochten de invloed van mutatie en disfunctie van de mitochondriale kinase *PTEN-induced putative kinase 1* (PINK1) bij de pathogenese van parkinson. Zowel Parkin als PINK1 zijn betrokken bij de functie van mitochondriën. Parkin zit in het cytosol en functioneert als een E3 ubiquitine ligase, terwijl PINK1 zich op het buitenste mitochondriaal membraan bevindt. Parkin wordt, afhankelijk van PINK1, naar beschadigde mitochondriën getransporteerd. Er is gevonden dat in dopaminerge neuronen van parkinsonpatiënten, waarbij PINK1 gemuteerd is, het transport van Parkin naar de mitochondriën verminderd. Het inbrengen van wild-type PINK1 verbeterde herstelde het Parkin-transport. Dit is voor het eerst in cellen onderzocht van patiënten met parkinson.[29] Het gebruik van iPSC speelt hier een cruciale rol bij, aangezien men nu ook de humane mitochondriën kan meenemen bij het onderzoek.

Bij bepaalde ziektes komt het voor dat de oorzaak niet in de neuronen ligt, maar juist in andere cellen. Amyotrofe laterale sclerose (ALS) is een progressieve neurodegeneratieve ziekte die zich op volwassen leeftijd uit. Het wordt gekarakteriseerd door fatale verlamming van motorneuronen in zowel het brein als in de ruggenmerg. ALS wordt veroorzaakt door een genetische mutatie in het gen voor het enzym superoxide-dismutase-1 (SOD1). Het idee dat de oorzaak van ALS in andere cellen dan neuronen zou kunnen liggen is voortgekomen door onderzoeken met muizen. Hierbij zorgden verlaagde concentraties van gemuteerd SOD1 in microglia en astrocyten voor een vertraagde progressie van de ziekte. Een ander onderzoek met muizen liet zien dat astrocyten met gemuteerd SOD1 zorgden voor toxiciteit voor zowel wild type neuronen als SOD1-mutante neuronen.[30] Ook is bekend dat overexpressie van mutant SOD1 in humane astrocyten zorgt voor neurontoxiciteit.[31] Echter, wat nog niet bekend is, is of astrocyten van ALS-patiënten met slechts één mutant SOD1 zorgt voor eenzelfde mate van neurontoxiciteit. Of hoe de biochemische netwerken precies werken. Het is namelijk erg lastig om hier een *in vitro* model van te creëren, aangezien interacties tussen neuronen en andere cellen of zelfs hele neuron-netwerken belangrijk zijn. Hier kan het gebruik van iPSC een grote rol spelen, aangezien men het patiënt-specifieke genoom direct overneemt in het onderzoeksmodel en kan toepassen op verschillende celtypes.

Een ander voorbeeld waarbij het iPSC laten differentiëren naar verschillende celtypes een grote rol speelt is bij huntington. De ziekte van Huntington (*Huntington's disease; HD*) is een erfelijke neurodegeneratieve ziekte die wordt gekarakteriseerd door bewegingsstoornissen, cognitieve achteruitgang en psychische symptomen. De ziekte wordt veroorzaakt door een CAG-herhaling in het *huntingtin*-gen (*HTT*), wat zorgt voor een polyglutamineketen in het HTT-eiwit. Proteolyse van het HTT-eiwit zorgt voor onoplosbare eiwitaggregaten die de karakteristieke inclusies vormen in de nucleus en het cytoplasma. Alhoewel het HTT-eiwit door het hele lichaam tot expressie wordt gebracht, vormen zich voornamelijk aggregaten in de neuronen van het striatum. Huntington komt zowel bij kinderen als bij volwassen voor en is afhankelijk van de hoeveelheid CAG-herhalingen. Tot en met 35 herhalingen uit de ziekte zich niet, pas vanaf 36 herhalingen kan de ziekte zich ontwikkelen. Er bestaat een verband tussen de hoeveelheid herhalingen en de leeftijd waarop de ziekte zich ontwikkelt; bij meer dan 55 herhalingen is de kans groot dat de ziekte zich al op jonge leeftijd ontwikkelt. In het onderzoek van Juopperi *et al.* zijn iPSC verkregen van huntington-patiënten met verschillende hoeveelheden CAG-herhalingen: de vader met 50 herhalingen en zijn dochter met 109 herhalingen. De iPSC werden zowel naar neuronen als naar astrocyten gedifferentieerd. Opvallend was dat er bij de neuronen zich geen duidelijk cellulair fenotype vormden, maar dit juist bij de astrocyten gebeurde. In de astrocyten vormden zich namelijk heldere

vacuoles. In de astrocyten gevormd uit de iPSC van de dochter, met 109 CAG-herhalingen, vormden zich duidelijk meer vacuoles dan in die van de vader of van de controle. Slechts een deel van de vacuoles bestond uit autofage vacuoles. De vorming van deze vacuoles vond plaats zonder ook maar enige toevoeging van stressoren. Astrocyten spelen een grote rol in het brein, waarbij ze zorgen voor essentiële en complexe functies, voornamelijk bedoelt voor het ondersteunen van neuronen. Het niet goed functioneren van astrocyten wordt vaker waargenomen bij neurodegeneratieve ziektes, maar de precieze functie hiervan bij huntington is nog niet goed in kaart gebracht. In voorgaande studies is al wel gezien dat eenzelfde soort vacuole-vorming voorkomt in lymfocyten van huntington-patiënten. Hieruit blijkt dat dit fenotype wellicht karakteristiek kan zijn voor de ziekte van Huntington en zou eventueel gebruikt kunnen worden als biomarker.[19]

iPSC als onderzoeksmodel is ook erg belangrijk betreffende onderzoek naar moleculaire mechanismen, zoals te zien in het onderzoek van Koch *et al*. Spinocerebellaire ataxie, ook bekend als de ziekte van Machado-Joseph (*Machado-Joseph disease; MJD*), is een ziekte die zich meestal pas op latere leeftijd uit en het wordt veroorzaakt door expansies van polyglutamineketens (CAG-herhalingen) in het *MJD1*-gen. Door proteolyse vormt het product van het *MJD*-gen, ataxin3 (ATXN3), onoplosbare eiwitaggregaten die een grote rol spelen bij de neurodegeneratie. Om de rol van de neuronspecifieke proteolyse bij het veroorzaken van de ziekte te onderzoeken, hebben Koch *et al.* iPSC verkregen van patiënten met MJD waarbij polyglutamineketens voorkwamen in zowel de iPSC als de uit de iPSC gedifferentieerde neuronen. Ze hebben laten zien dat door middel van L-glutamaat de neuronen te exciteren, er een Ca^{2+}-afhankelijke proteolyse van ATXN3 wordt geïnduceerd, wat leidt tot aggregaat vorming. De proteolyse vindt plaats dankzij een calpaïne die geactiveerd wordt door influx van calcium via *voltage-gated* calciumkanalen. Voor dit proces moet de cel zowel functionele natrium- en kaliumkanalen als ionotropische en *voltage-gated* caliumkanalen bevatten, plus het moet worden geëxciteerd. Dit leidt tot de specificiteit van het ziekte fenotype voor neuronen, wat overeenkomt met de afwezigheid van de aggregaat vorming in iPSC, fibroblasten of gliacellen. Vervolgstudies zouden echter nog wel kunnen kijken of vergelijkbare fenotypes voorkomen bij andere cellen die net als neuronen wordt geëxciteerd, zoals bijvoorbeeld hartcellen. Deze studie laat wel zien dat *late-onset* ziektes in model kunnen worden gebracht op een celtype specifieke manier, alhoewel de moleculaire mechanismen die de aggregaat vorming met de neurodegeneratie op latere leeftijd in verband legt nog onbekend is.[32]

Perspectief

Er bestaat nog een groot mysterie wat betreft de precieze oorzaak van idiopathische vormen van neurodegeneratieve ziektes. Bij het onderzoek naar idiopathische vormen van neurodegeneratieve ziektes, verwacht men hierbij dat de fenotypische overeenkomst tussen familiaire en idiopathische vormen ontstaan door dezelfde of vergelijkbare pathogene mechanismen. iPSC kunnen een cruciale rol spelen bij het ontdekken van deze mechanismen. Men kan met behulp van patiënt-specifieke iPSC inzicht krijgen in de eventuele genetische achtergrond van idiopathische vormen van neurodegeneratieve ziektes.

Late-onset ziektes zijn soms moeilijk waar te nemen in iPSC, aangezien de ziekte vaak een langere periode nodig heeft om tot uiting te komen. Een onderzoek van Soldner *et al* liet zien dat bij het generen van neuronen uit iPSC van een patiënt met een idiopathische vorm van parkinson, zich geen fenotype van parkinson vormde.[3333] Er zijn echter al wel *late-onset* ziektes in model gebracht met behulp van iPSC, zoals te zien is in het onderzoek van Seibler *et al.* (parkinson met PINK1-mutatie) en Koch *et al.* (spinocerebellaire ataxie). Er zal nog veel onderzoek moeten worden gedaan om deze *late-onset* ziektes in iPSC-model te verkrijgen.

Wat nog onduidelijk is, is de invloed van de mate van mutatie op de ziekte. Bij ziektes met CAG-herhalingen speelt de lengte van de CAG-herhaling een grote rol, een langere CAG-herhaling betekent een ernstigere mate van ziekte en een eerdere leeftijd waarop de ziekte begint. Echter, het probleem bij ziektes met CAG-herhalingen is dat dit lang niet altijd geldt. De ernst van en de leeftijd waarop een ziekte begint kan namelijk erg verschillen tussen patiënten die in de eerste instantie eenzelfde genetische achtergrond lijken te hebben. Met behulp van iPSC kan men onderzoeken wat er eventueel nog voor andere genetische factoren meespelen die bepalen wat de aanzet, of juist het uitstel, van de ziekte bepaald.

Cel-vervangende therapieën behoren tot een toekomst die neurodegeneratieve ziektes wellicht voor goed de wereld uit kunnen helpen. Echter op het moment is het nog lang niet zo ver. Ondanks dat via iPSC het probleem van uitstoting door het immuunsysteem wordt tegengegaan, zorgt het inbrengen van cellen in het brein over het algemeen alleen maar voor wildgroei. Sterker nog, één van de controles op of er pluripotente stamcellen zijn verkregen is het inbrengen van de cellen waarbij verwacht wordt dat er teratomen vormen. Echter, in het onderzoek van Jeon *et al* bleek men wel cellen te kunnen introduceren in het rattenbrein. De geïntroduceerde neuronvoorlopercellen verbeterde zelfs de symptomen van huntington in dit model. Ook al was dit slechts een diermodel voor parkinson, door middel van een lesie, en hadden de geïntroduceerde cellen een huntington-genoom, feit blijft dat er geen wildgroei plaatsvond tot het eind van het onderzoek, tenminste 40 weken.[34] Wellicht zijn cel-vervangende therapieën in de nabije toekomst toch te verwezenlijken.

Een andere optie om humane cellen te verkrijgen is het gebruik van embryonale stamcellen. Deze kunnen differentiëren naar de betreffende cellen, zoals neuronen, die men wil onderzoeken en dragen daarnaast het gehele humane genoom. Echter ook hier speelt het gebrek aan een patiëntspecifiek genoom een rol. Ten eerste bestaat de voornaamste bron van ESC uit niet-patiëntspecifieke versies. Om een patiëntspecifieke ESC te krijgen zou het genoom van bevruchte eicellen moeten worden vervangen met het genoom van de patiënt. Dit is een arbeidsintensief proces waarbij ook nog eens een grote ethische kwestie bij speelt. Het gebruik van ESC is controversieel en voordat er onderzoek mee mag worden gedaan moet het onderzoek zelf van zodanig nut zijn dat het door een ethische commissie wordt toegestaan. Niet elk onderzoek kan dus zomaar worden uitgevoerd met behulp van ESC en ESC zijn daardoor ook niet een betrouwbare bron van cellen om onderzoek op te doen. Het gebruik van iPSC kan uitkomst bieden in het geval van patiënt- en ziekte-specificiteit en wordt men niet teruggehouden door ethische kwesties.[29,34]

Conclusie

Neurodegeneratieve ziektes zijn aandoeningen die nog niet volledig begrepen worden. Er zijn nog veel aspecten die onduidelijk zijn, waardoor er geen goede geneesmiddelen of behandelmethodes kunnen worden ontwikkelt. Het gebruik van iPSC levert *in vitro* cellen die kunnen worden gedifferentieerd naar elke willekeurige cel, zonder ethische kwesties. Doordat men iPSC kan maken uit de cellen van de patiënt kan men specifieke ziektes in model brengen, waardoor het gebruik van iPSC als onderzoeksmodel mogelijkheden biedt tot het ontdekken van de mechanismen die deze ziektes veroorzaken. Ondanks dat de generatie van iPSC traag is en soms integratie in het genoom ondervindt, geeft het toch grote voordelen op oudere technieken. Wellicht zullen iPSC ooit kunnen worden gebruikt in cel-vervangende therapiën.

Referenties

1. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-676.

2. Imamura K, Inoue H. Research on neurodegenerative diseases using induced pluripotent stem cells. *Psychogeriatrics*. 2012;12(2):115-119.

3. Barrero MJ. The stability of the induced epigenetic programs. *Comp Funct Genomics*. 2012;2012:434529.

4. Verrijzer CP, Kal AJ, van der Vliet PC. The oct-1 homeo domain contacts only part of the octamer sequence and full oct-1 DNA-binding activity requires the POU-specific domain. *Genes Dev*. 1990;4(11):1964-1974.

5. Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, et al. Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell*. 1998;95(3):379-391.

6. Pevny LH, Lovell-Badge R. Sox genes find their feet. *Curr Opin Genet Dev*. 1997;7(3):338-344.

7. Chew JL, Loh YH, Zhang W, et al. Reciprocal transcriptional regulation of Pou5f1 and Sox2 via the Oct4/Sox2 complex in embryonic stem cells. *Mol Cell Biol*. 2005;25(14):6031-6046.

8. Walia B, Satija N, Tripathi RP, Gangenahalli GU. Induced pluripotent stem cells: Fundamentals and applications of the reprogramming process and its ramifications on regenerative medicine. *Stem Cell Rev*. 2012;8(1):100-115.

9. Rowland BD, Bernards R, Peeper DS. The KLF4 tumour suppressor is a transcriptional repressor of p53 that acts as a context-dependent oncogene. *Nat Cell Biol*. 2005;7(11):1074-1082.

10. Wernig M, Meissner A, Cassady JP, Jaenisch R. c-myc is dispensable for direct reprogramming of mouse fibroblasts. *Cell Stem Cell*. 2008;2(1):10-12.

11. Lin CH, Lin C, Tanaka H, Fero ML, Eisenman RN. Gene regulation and epigenetic remodeling in murine embryonic stem cells by c-myc. *PLoS One*. 2009;4(11):e7839.

12. Huangfu D, Maehr R, Guo W, et al. Induction of pluripotent stem cells by defined factors is greatly improved by small-molecule compounds. *Nat Biotechnol*. 2008;26(7):795-797.

13. Ho R, Chronis C, Plath K. Mechanistic insights into reprogramming to induced pluripotency. *J Cell Physiol*. 2011;226(4):868-878.

14. Sigma-Aldrich. **Embryonic and induced pluripotent stem cells**. http://www.sigmaaldrich.com/life-science/stem-cell-biology/ipsc.html. Accessed 06/27, 2012.

15. Song M, Paul S, Lim H, Dayem AA, Cho SG. Induced pluripotent stem cell research: A revolutionary approach to face the challenges in drug screening. *Arch Pharm Res*. 2012;35(2):245-260.

16. Tavernier G, Wolfrum K, Demeester J, De Smedt SC, Adjaye J, Rejman J. Activation of pluripotency-associated genes in mouse embryonic fibroblasts by non-viral transfection with in vitro-derived mRNAs encoding Oct4, Sox2, Klf4 and cMyc. *Biomaterials*. 2012;33(2):412-417.

17. Ralston A, Rossant J. The genetics of induced pluripotency. *Reproduction*. 2010;139(1):35-44.

18. Perrier AL, Tabar V, Barberi T, et al. Derivation of midbrain dopamine neurons from human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004;101(34):12543-12548.

19. Juopperi TA, Kim WR, Chiang CH, et al. Astrocytes generated from patient induced pluripotent stem cells recapitulate features of huntington's disease patient cells. *Mol Brain*. 2012;5(1):17.

20. Byers B, Cord B, Nguyen HN, et al. SNCA triplication parkinson's patient's iPSC-derived DA neurons accumulate alpha-synuclein and are susceptible to oxidative stress. *PLoS One*. 2011;6(11):e26159.

21. Thier M, Worsdorfer P, Lakes YB, et al. Direct conversion of fibroblasts into stably expandable neural stem cells. *Cell Stem Cell*. 2012;10(4):473-479.

22. Jung YW, Hysolli E, Kim KY, Tanaka Y, Park IH. Human induced pluripotent stem cells and neurodegenerative disease: Prospects for novel therapies. *Curr Opin Neurol*. 2012;25(2):125-130.

23. Wang H, Doering LC. Induced pluripotent stem cells to model and treat neurogenetic disorders. *Neural Plast*. 2012;2012:346053.

24. Grskovic M, Javaherian A, Strulovici B, Daley GQ. Induced pluripotent stem cells--opportunities for disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Drug Discov*. 2011;10(12):915-929.

25. Durnaoglu S, Genc S, Genc K. Patient-specific pluripotent stem cells in neurological diseases. *Stem Cells Int*. 2011;2011:212487.

26. Lee G, Papapetrou EP, Kim H, et al. Modelling pathogenesis and treatment of familial dysautonomia using patient-specific iPSCs. *Nature*. 2009;461(7262):402-406.

27. Chamberlain SJ, Li XJ, Lalande M. Induced pluripotent stem (iPS) cells as in vitro models of human neurogenetic disorders. *Neurogenetics*. 2008;9(4):227-235.

28. Martinez-Morales PL, Liste I. Stem cells as in vitro model of parkinson's disease. *Stem Cells Int*. 2012;2012:980941.

29. Seibler P, Graziotto J, Jeong H, Simunovic F, Klein C, Krainc D. Mitochondrial parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells. *J Neurosci*. 2011;31(16):5970-5976.

30. Kanning KC, Kaplan A, Henderson CE. Motor neuron diversity in development and disease. *Annu Rev Neurosci*. 2010;33:409-440.

31. Marchetto MC, Muotri AR, Mu Y, Smith AM, Cezar GG, Gage FH. Non-cell-autonomous effect of human SOD1 G37R astrocytes on motor neurons derived from human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2008;3(6):649-657.

32. Koch P, Breuer P, Peitz M, et al. Excitation-induced ataxin-3 aggregation in neurons from patients with machado-joseph disease. *Nature*. 2011;480(7378):543-546.

33. Soldner F, Hockemeyer D, Beard C, et al. Parkinson's disease patient-derived induced pluripotent stem cells free of viral reprogramming factors. *Cell*. 2009;136(5):964-977.

34. Jeon I, Lee N, Li JY, et al. Neuronal properties, in vivo effects and pathology of a huntington's disease patient-derived induced pluripotent stem cells. *Stem Cells*. 2012.