

## **Promotie: Taaislijmziekte in het laboratorium nagebootst met 'minidarmen' - Florijn Dekkers**

*Nederlandse samenvatting*

### **Hoofdstuk 1: Introductie**

Ieder persoon zit anders in elkaar. Hierdoor komen ziektes verschillend tot uiting en reageert iedereen op zijn eigen manier op medicatie. De ontwikkeling van op maat gemaakte therapie voor de individuele patiënt is een belangrijke focus van de hedendaagse gezondheidszorg, zo ook voor mensen met taaislijmziekte of cystische fibrose (CF). CF is de meest voorkomende levensverkortende erfelijke ziekte in de westerse wereld. Wereldwijd lijden er ongeveer 85.000 mensen aan. CF-patiënten hebben problemen in verschillende organen, waaronder de longen, darmen en alvleesklier. De gemiddelde levensverwachting voor pasgeborenen met deze aandoening is ~37 jaar.

CF wordt veroorzaakt door mutaties in het zogeheten CFTR-gen (stukje erfelijk materiaal), waarvan ongeveer 2000 verschillende variaties zijn beschreven. De type mutatie bepaalt op welke manier het CFTR-eiwit (het gen-product) niet goed functioneert. Dit eiwit fungeert in de cel als kanaal voor zouten, zoals chloride en bicarbonaat, en is essentieel voor de vloeistof huishouding van verschillende organen. Als CFTR niet goed functioneert leidt dit in de long tot productie van een taaie slijmlaag en chronische infecties. Een individu krijgt CF als hij zowel van zijn moeder als vader een CFTR-mutatie erft. De combinatie van CFTR-mutaties (het CFTR-genotype), de rest van het erfelijk materiaal en omgevingsfactoren bepalen samen de ernst van de ziekte en reactie op medicatie van een CF-patiënt. Over het algemeen leiden de zogeheten 'zware' mutaties tot een ernstig ziektebeeld, terwijl de 'milde' mutaties zich uiten in een minder ernstig ziektebeeld. Toch verschilt het ziektebeeld ook aanzienlijk tussen patiënten met dezelfde mutaties om redenen die we nog niet goed begrijpen.

Op het gebied van CF-medicatie is er een belangrijk tijdperk aangebroken. Terwijl de conventionele behandeling voornamelijk gericht is op het onderdrukken van symptomen die gepaard gaan met de ziekte, zijn er gedurende de laatste 10 jaar middelen ontwikkeld die aangrijpen op het onderliggende defect in CF: het gemuteerde CFTR-eiwit. Deze CFTR-reparerende middelen zouden mogelijk in de toekomst de ziekte kunnen genezen.

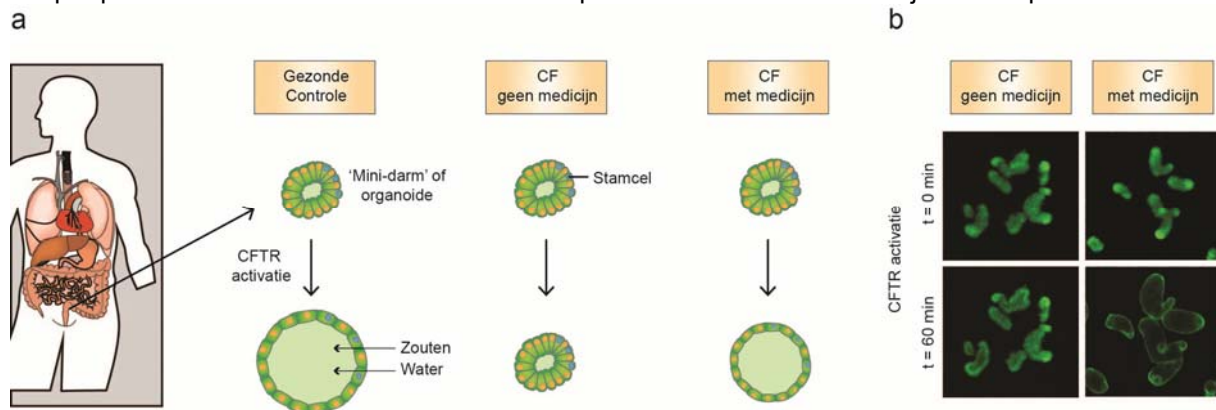
Sinds kort zijn er twee van dit soort medicijnen op de markt (lees hierover meer in hoofdstuk 7), en dit is een enorme doorbraak. Helaas is deze medicatie nog lang niet voor alle patiënten beschikbaar en werkt het bij veel patiënten nog niet zo goed. Bovendien is de reactie van patiënten die deze medicatie krijgen heel verschillend. Het is dus van belang dat er effectievere CFTR-reparerende medicatie wordt ontwikkeld en dat we juist die patiënten kunnen behandelen die ook daadwerkelijk op de medicatie reageren.

Hiervoor is het van groot belang dat we in het lab modellen ontwikkelen die het individu zo goed mogelijk nabootsen en waarin we de functie van het CFTR-eiwit zo nauwkeurig mogelijk kunnen bepalen. Met persoonsgebonden modellen in het lab kunnen we (i) verschillen tussen patiënten beter leren begrijpen, (ii) effectievere medicatie ontwikkelen en (iii) toewerken naar een optimale behandeling voor de individuele patiënt. Dit proefschrift beschrijft de ontwikkeling van een nieuw model om iedere unieke patiënt in het laboratorium te kunnen bestuderen.

### **Hoofdstuk 2: de CF-patiënt nabootsen met mini-darmen**

Door recente technologische ontwikkelingen is het mogelijk om darmstamcellen van een persoon 'oneindig' te vermenigvuldigen in het laboratorium in de vorm van 'mini-darmen' of organoiden. Zulke intestinale organoiden maken wij in het laboratorium van kleine hapjes weefsel (biopten) uit het rectum van CF-patiënten of gezonde personen. Ongeveer vier jaar geleden ontdekten wij iets interessants: als we CFTR in organoiden van gezonde personen activeren, zwellen de structuren in korte tijd flink op. Dit komt omdat er in organoiden een holte aanwezig is die wordt gevuld met zouten en vocht zodra het CFTR-kanaal na activatie open gaat, alsof er een ballon wordt opgeblazen. Omdat CFTR in patiënten met taaislijmziekte afwezig is of niet goed werkt is deze zwelling in organoiden van mensen met CF afwezig of verminderd (Fig. 1a). Door middel van fluorescentie microscopie en speciale software kunnen we deze zwelling van een heleboel organoiden tegelijk heel nauwkeurig meten. Zo hebben we gezien dat de ernst van de CFTR-mutaties samenhangt met de hoeveelheid zwelling (zware mutatie = weinig zwelling; milde mutatie = meer zwelling). Ook zien we dat CFTR-reparerende middelen in CF-organoiden de zwelling weer kunnen herstellen (Fig. 1a,b). Kortom, de mate van

zwellung van mini-darmen is dus een uitleesmaat voor de activiteit van CFTR en kan worden gebruikt om per patiënt de functie van CFTR en reactie op CFTR-herstellende medicijnen te bepalen.



**Figuur 1. Een nieuwe methode om CFTR-functie te meten in mini-darmen of organoïden.** (a) Een illustratie van zwellung van organoïden na CFTR activatie. Organoïden bestaan uit een verzameling van cellen, waaronder stamcellen. (b) Microscopie afbeeldingen van CF-organoïden met of zonder medicijnbehandeling en voor of na activatie van CFTR. We kleuren de cellen fluorescerend groen om ze zichtbaar te maken onder de microscoop.

### Hoofdstuk 3: efficiënt 'repareren' door te combineren

F508del is de meest voorkomende mutatie die wordt gedragen door ~90% van alle patiënten met CF. Om deze reden wordt er voornamelijk onderzocht hoe wij het chloridekanaal met specifiek deze mutatie (CFTR-F508del) kunnen repareren. Om goed te kunnen functioneren moet CFTR in een cel op de juiste manier worden 'gevouwen' en getransporteerd. Je kunt je CFTR voorstellen als een groot papier, pas als het papier goed gevouwen is kan het vliegtuig vliegen en op de juiste bestemming aankomen. Bij CFTR-F508del is vouwing en transport verstoord en wordt het eiwit door de cel opgeruimd. Dit is te vergelijken met een mis gevouwen vliegtuig wat je als een propje weggooit.

Speciale medicijnen genaamd 'correctoren' kunnen aan het CFTR-F508del eiwit binden en de vouwing verbeteren. Als het ware gebruik je een plakbandje om een verkeerd gevouwen vliegtuig qua vorm bij elkaar te houden. In samenwerking met de onderzoeksgroep van G. Lukacs uit Canada hebben we in organoïden onderzocht hoe we zo efficiënt mogelijk met deze correctoren de vouwing van het CFTR-F508del kunnen herstellen. We vonden dat verschillende correctoren op een andere plaatsen in het CFTR-F508del aangrijpen en elkaars werking sterk verbeteren. Je hebt als het ware je papieren vliegtuigje op meerdere plekken met verschillende plakbandjes verstevigd, en de combinatie van deze plakbandjes werkt veel beter dan de losse plakbandjes bij elkaar opgeteld. De tweede generatie corrector therapie die nu wordt ontwikkeld voor CFTR-F508del bestaat uit dit soort elkaar versterkende medicijnen en kan de effectiviteit van behandeling sterk verbeteren.

### Hoofdstuk 4: verschil moet er zijn

Naast CFTR-F508del bestaan er ook andere mutaties die leiden tot een verstoring van eiwitvouwing en transport. Zijn correctoren voor verschillende CFTR-mutanten even effectief? Dit hebben we onderzocht in organoïden van CF-patiënten met de F508del-, N1303K- of A455E-mutatie. De resultaten hebben aangetoond dat CFTR-N1303K door geen enkele corrector kan worden gerepareerd. Of anders gezegd, geen enkele plakmethode kan het papieren vliegtuig beter laten vliegen. Voor patiënten met deze mutatie moeten dus andere medicijnen ontwikkeld worden. VX-809 is momenteel de enige CFTR-corrector die recentelijk als medicijn is goedgekeurd en werkt het meest optimaal voor patiënten met F508del. Onze studie liet zien dat andere correctoren dan VX-809 veel beter werken voor CFTR-A455E. Oftewel, het ene type papieren vliegtuig kun je beter repareren met lijm, terwijl je het andere type vliegtuig beter kan repareren met plakband. A455E is de op één na meest voorkomende mutatie bij Nederlandse CF-patiënten. We zijn op dit moment op zoek naar een al bestaand medicijn wat specifiek voor deze patiënten als efficiënte corrector kan werken.

## **Hoofdstuk 5: 'super food' voor CF-patiënten?**

Bij sommige CF-patiënten is de vouwing en transport van CFTR normaal, maar is juist het proces van openen (gating) verstoord. Stoffen die het CFTR-kanaal kunnen 'potentiëren' en hiermee gating kunnen herstellen noemen we 'potentiators'. VX-770 is momenteel de enige potentiator die als medicijnen beschikbaar is CF-patiënten met een gating mutatie (~5% van alle patiënten). Omdat dit medicijn het ziektebeeld wel kan verbeteren maar niet kan genezen wordt er nog steeds hard gezocht naar betere therapieën.

Sommige natuurlijke stoffen kunnen het CFTR-kanaal ook potentiëren, zoals een extract uit de geelwortel (curcumine) en het hoofdbestanddeel van soja (genisteïne). In organoiden van patiënten met gating-mutaties hebben we aangetoond dat alle drie de stoffen elkaars werking versterken. Deze data wijzen erop dat zowel VX-770, curcumine als genisteïne een ander werkingsmechanisme hebben en ondersteunen het gebruik van potentiator combinaties als therapie voor CF. In Nederland worden er nu ongeveer 35 patiënten behandeld met VX-770. Voor een aantal van deze patiënten wordt momenteel in een klinische studie onderzocht of het extra toedienen van het voedingssupplement genisteïne positieve effecten heeft op hun gezondheid.

## **Hoofdstuk 6: astmamedicatie hergebruiken voor CF?**

Het CFTR chloride kanaal staat vooral dicht en het openen wordt door hormonen of andere lichaamseigen stoffen geactiveerd. Medicijnen die standaard worden gebruikt ter behandeling van astma, zoals salbutamol, kunnen ook het CFTR openen door de lichaamseigen stoffen na te bootsen. We hebben in organoiden laten zien dat zulke astma medicijnen CFTR inderdaad kunnen activeren, maar alleen voor CFTR varianten die geassocieerd zijn met een relatief mild ziektebeeld, zoals CFTR-R117H en CFTR-A455E. In een klinische studie hebben we de toediening van salbutamol bij CF-patiënten met deze mutaties bestudeert. Met behulp van organoiden konden wij een geringe activiteit van het medicijn in het bloed van patiënten terugvinden, wat gepaard ging met een zeer milde maar toch significante klinische verbetering. Deze studie geeft aan dat organoiden nuttig kunnen zijn om reeds bestaande medicatie te hergebruiken voor patiënten met CF. De lange termijn effectiviteit en veiligheid van salbutamol bij patiënten met CF moet in vervolgstudies verder worden onderzocht.

## **Hoofdstuk 7: de effectiviteit van medicijnen voorspellen in het lab**

Er zijn momenteel twee CFTR-reparerende of 'genezende' medicijnen ontwikkeld. De potentiator VX-770 is geregistreerd voor negen verschillende CF-mutaties (~5% van alle patiënten) en VX-809 in combinatie met VX-770 is goedgekeurd voor patiënten homozygoot voor F508del (~45-50% van alle patiënten). We streven ernaar om deze medicijnen zo snel mogelijk beschikbaar te stellen voor patiënten met andere mutaties die ook baat hebben bij deze medicatie. Helaas zijn de conventionele klinische studies duur en tijdrovend en niet mogelijk voor kleine groepen patiënten of individuen met zeldzame CFTR-mutaties. Kunnen we organoiden gebruiken om de reactie van patiënten met zeldzame mutaties op bestaande therapieën te voorspellen? In dit hoofdstuk hebben we de reactie op VX-770, VX-809 of de combinatie bestudeerd in organoiden van patiënten met allerlei verschillende CFTR-mutaties. Terwijl voor sommige organoiden geen enkele behandeling effectief was, reageerde anderen sterk op VX-770 (G1249R) of de combinatiebehandeling (A455E). De organoiden hadden goed voorspeld: twee patiënten met de zeer zeldzame G1249R reageerden beiden erg goed op VX-770 en kunnen nu deze behandeling blijven krijgen. Deze aanpak is momenteel uniek in de wereld, en vormt mogelijk een kosteneffectieve methode om deze dure medicijnen zo snel mogelijk bij de juiste patiënten te krijgen. Er lopen momenteel een vijftal klinische studies om de voorspellende waarde van het model verder te valideren.

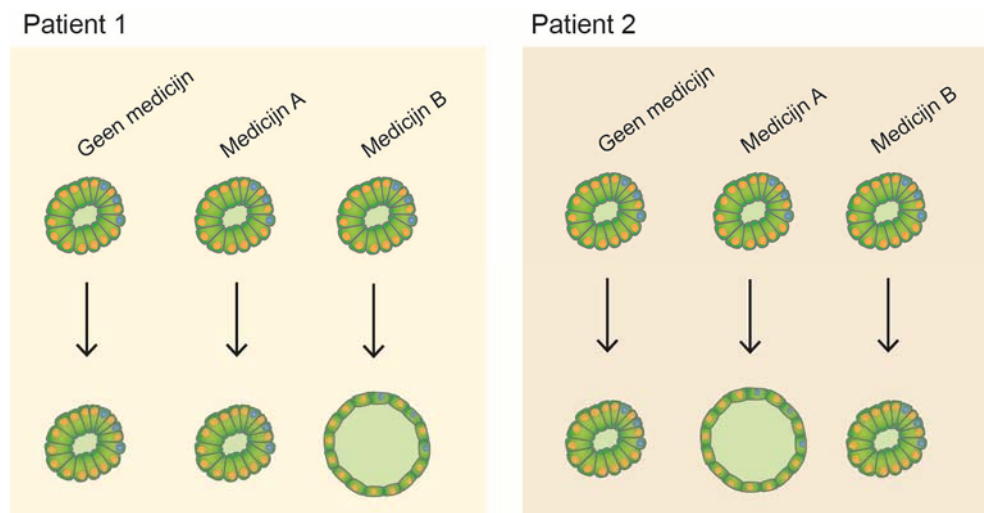
## **Hoofdstuk 8: knutselen aan genetisch materiaal**

In hoofdstuk 8 schakelen we over naar de ontwikkeling van een echte genezing van CF die voor alle patiënten kan werken door een nieuwe vorm van genterapie te ontwikkelen. Het doel: in stamcellen het defecte gen vervangen door een gezond gen. Een mogelijke strategie is als volgt: (i) in het laboratorium wordt het gemuteerde gen in stamcellen van de patiënt gerepareerd, (ii) stamcellen met de juiste genetische correctie worden vermeerderd in het laboratorium en (iii) de gerepareerde stamcellen worden in de long de patiënt terug getransplanteerd. Hoewel we dit stadium nog lang niet

hebben bereikt is de eerste belangrijke stap gezet. In samenwerking met het lab van Prof. H. Clevers (Hubrecht Instituut, Utrecht) hebben we namelijk aangetoond dat we het gemuteerde CFTR-gen in de stamcellen van intestinale CF-organoiden op een hele specifieke manier kunnen repareren. Een belangrijke volgende stap is om dit te vertalen naar de long. De toekomst zal uitwijzen of in het laboratorium gerepareerde stamcellen op een efficiëntere en veilige manier kunnen worden gebruikt voor behandeling van CF.

### Conclusie

Dit boekje beschrijft een nieuwe meetmethode in intestinale organoiden om de functie van CFTR voor elk individu op een hele nauwkeurige manier te kunnen bepalen. Dit model leert ons taaislijmziekte beter te begrijpen en speelt een belangrijke rol in de ontwikkeling van 'genezende' CF-therapieën en op maat gemaakte medicatie voor de individuele patiënt. Zo hopen we voor iedere patiënt met organoiden te kunnen gaan voorspellen welke medicatie het beste past (Fig. 2). In hoeverre organoiden de reactie op medicatie kunnen voorspellen gaan we in grote studies verder onderzoeken. Het belangrijkste doel op korte termijn is om door middel van organoiden de bestaande CFTR modulerende stoffen (VX-770 en VX-809) beschikbaar te stellen voor zoveel mogelijk patiënten met zeldzame mutaties die baat hebben bij deze middelen. Ongetwijfeld zal dit model bijdragen aan de ontwikkeling van 'genezende' medicatie voor uiteindelijk 100% van alle patiënten met CF.



**Figuur 2. Op maat gemaakte medicatie door middel van organoiden.**

Met behulp van intestinale organoiden kunnen we per patiënt de reactie op verschillende medicijnen bepalen. In dit voorbeeld zou patiënt 1 geholpen zijn met het medicijn B, terwijl patiënt 2 geholpen is met medicijn A. We gaan nog verder uitzoeken hoe goed deze metingen de reactie bij de patiënt zelf kunnen voorspellen.