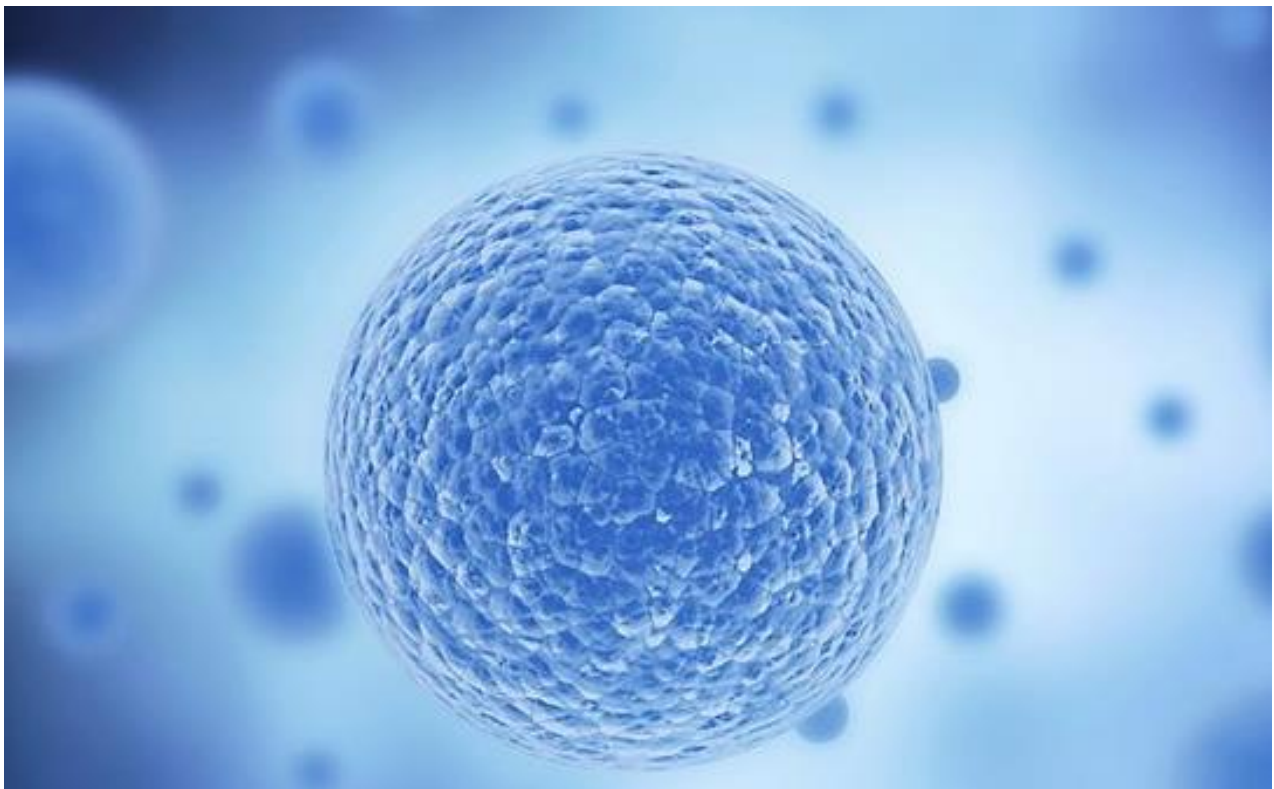


iPSC til behandling af cystisk fibrose med fokus på pancreas



Emilie Munk

Bagsværd Kostskole og Gymnasium

SUND

Forskerkontakt: Mette Christine Jørgensen, Stabsforsker, Danstem, KU

Projekt forskerspirer 2018

Indhold

Indledning.....	2
Afgrænsning og problemformulering.....	3
Metodevalg, teori og empiri	3
Rezania-Kieffer protokollen	4
Fluorescence-activated cell sorting (FACS).....	4
iPSC fremfor hESC	5
Projektets udførsel.....	6
Forsøgsdesign	6
Budget	7
Konklusion og perspektivering.....	8
Tak.....	9
Litteraturliste	9
Forskningsartikler.....	9
Netartikler/hjemmesider:.....	9
Bilag	10

Indledning

I 2006 lykkedes det japaneren Shinya Yamanaka at fremstille inducerede pluripotente stamceller (iPSC) ved at ”tilbagedifferentiere” celler fra en hudbiopsi til pluripotente stamceller. Dette har banet vejen for nye muligheder inden for forskning og behandling af en lang række sygdomme (Hadenfeld, Pusch, Peitz, et Bruestle 2018).

En sygdom, der har en mangelfuld behandling, er cystisk fibrose (CF). CF er den hyppigste genetisk nedarvede sygdom i Vesteuropa, ca. 500 mennesker lider af sygdommen i Danmark, og den gennemsnitlige levealder for en patient er ca. 40 år. CF nedarves recessivt, man skal altså arve et muteret gen fra begge sine forældre, før man udvikler den (Borg 2015). CF skyldes en mutation i CFTR-genet (Stanford Medicine 2018), der koder for proteinet CFTR, der fungerer som en ionkanal i cellemembranerne i kroppens epitelceller. Ionkanalerne sørger for, at der kan blive transporteret Cl^- over cellemembranen, så salt- og væskebalancen i kroppen kan reguleres (Uniprot 2018). En mutation i CFTR-genet medfører, at ionkanalerne ikke er funktionelle, og derfor kan der ikke oprettholdes en normal saltbalance i kroppen, hvilket fører til dehydrering af kroppens sekreter. Denne dehydrering har blandt andet stor effekt på pancreas, hvor ionkanalerne i ductcellerne ikke fungerer, så væske kan ikke diffundere over cellemembranen. Dette medfører, at enzymer ophobes og blokerer ductene i pancreas grundet den lave gennemstrømning af væske¹ (Wilschanski et Novak 2013).

Den eksisterende behandling af CF i pancreas er mangelfuld, idet sygdommen ikke behandles direkte. CF-patienter indtager med hvert måltid tabletter med fordøjelsesenzymer, der bevirker, at patienten kan fordøje maden og optage næringstofferne fra kosten. Mange patienter har dog svært ved at optage næring nok (Stanford Medicine 2018), og behandlingen forhindrer heller ikke ophobningen af enzymer i pancreas, så pancreas vil med tiden blive mere og mere ødelagt, hvilket fører til, at mange patienter udvikler diabetes (Wilschanski et Novak 2013). Alt dette er med til at forringe patienternes livskvalitet og helbred. Derfor er det interessant at undersøge, om det er muligt at behandle cystisk fibrose med iPSC, da patienterne så får raske og funktionelle celler i pancreas, så enzymtilskud, underernæring og diabetes kan undgås, og livskvaliteten og helbredet dermed forbedres.

¹ Se bilag 1 for figur

Afgrænsning og problemformulering

Det er lykkedes en gruppe forskere at udvikle raske iPSC fra en patient med CF ved hjælp af CRISPR/CAS9 (Firth et al. 2015). Det næste skridt frem mod en behandling i pancreas er derfor differentieringen af de raske iPSC til funktionelle pancreas ductceller.

I mit projekt vil jeg derfor undersøge følgende problemformulering:

Er det muligt at differentiere iPSC til funktionelle pancreas ductceller med udgangspunkt i Rezanian-Kieffer protokollen til differentiering af endokrine pancreas celler fra pluripotente stamceller med henblik på at anvende de færdigdifferencierede iPSC til behandling af cystisk fibrose i pancreas.

Ud fra ovenstående problemformulering og litteraturstudier gennem forløbet har jeg opstillet følgende hypotese, som jeg vil forsøge at eftervise eller afvise gennem mit projekt:

Ved at stoppe differentieringen af endokrine pancreas celler inden stadie 5 i Rezanian-Kieffer protokollen kan man udvikle funktionelle pancreas ductceller fra iPSC.

I mit projekt har jeg bevidst valgt udelukkende at fokusere på differentieringen af iPSC, da det er her, jeg vil kunne bidrage til videre forskning indenfor behandling af CF i pancreas. Forskning i behandlingsmetode med færdigdifferencierede celler er ikke inddraget, da differentiering af iPSC er en meget omfattende proces i sig selv. Dermed har jeg valgt alene at lægge fokus her. Mit forsøg vil derfor også være et pilotforsøg, der skal vise, om det er muligt at differentiere pancreas ductceller med den metode, jeg anvender. Efterfølgende vil et større forsøg på baggrund af mit projekt kunne opstilles, såfremt mit forsøg lykkes.

Derudover kunne jeg også have valgt at se på anvendelsen af iPSC til behandling af andre symptomer på CF i kroppen, som eksempelvis symptomerne i lungerne eller tarmepitelet. Her har jeg dog specifikt valgt pancreas, da jeg mener, pancreas er et godt udgangspunkt til forsøg på behandling af CF med iPSC, da pancreas umiddelbart er mere tilgængelig at lave forsøg på end eksempelvis lungerne, hvor et indgreb er noget mere kompliceret.

Metodevalg, teori og empiri

I mit projekt arbejder jeg ud fra en hypotetisk deduktiv metode, idet jeg gennem mit forsøg forsøger at eftervise en i forvejen opstillet hypotese.

Rezania-Kieffer protokollen

I mit projekt tager jeg udgangspunkt i Rezania-Kieffer protokollen til differentiering af endokrine pancreas celler fra humane embryonale stamceller (hESC) (Rezania et al. 2014a) for at få differentieret iPSC til pancreas ductceller. Selvom protokollen har til formål at fremstille endokrine pancreas celler, er processen fra stamceller til endokrine og eksokrine pancreas celler langt hen ad vejen den samme. Derfor mener jeg, det vil være en fordel at tage udgangspunkt i Rezania-Kieffer protokollen for at fremstille eksokrine pancreas ductceller.

I stadiet 4 i differentieringsprotokollen er stamcellerne udviklet til endoderme pancreas celler, der stadig har potentiale til at udvikle sig til endokrine og eksokrine pancreas ductceller. Markører for om stamcellerne udvikler sig til endokrine eller eksokrine pancreas ductceller, er generne NGN3 og SOX9. $NGN3^+$ -celler har potentiale til at udvikle sig til endokrine celler, mens $SOX9^+$ -celler er eksokrine pancreas celler (Rezania et al. 2014a), hvor en del af dem spontant bør udvikle sig til eksokrine pancreas ductceller. Af figur 1B i protokollen² (Rezania et al. 2014a) ses det, at antallet af $SOX9^+$ -celler er størst i stadiet 4, mens antallet af $NGN3^+$ -celler er lavest her. Jeg vælger derfor at stoppe differentieringen med Rezania-Kieffer protokollen her og sortere de $SOX9^+$ -celler fra ved hjælp af fluorescence-activated cell sorting, så jeg kun får de eksokrine celler, jeg er interesseret i.

Det er dog værd at nævne, at der er en række udfordringer ved at differentiere celler efter en differentieringsprotokol. Differentiering af stamceller er en kompleks proces, og der er stor usikkerhed i, hvorvidt cellerne differentieres til de ønskede celler i de forskellige stadier. De mindste fejl eller forskelle fra protokollen medfører fejl i differentiationen. Det er dermed også meget vigtigt, at alle stadierne udføres med høj præcision. Derfor har jeg også angivet forhandler og katalog nr. i mit budget, da produkter af en anden producent kan være nok til, at der sker fejl i differentiationen.

Fluorescence-activated cell sorting (FACS)

Til at frasortere de $SOX9^+$ -celler vælger jeg at anvende metoden Fluorescence-activated cell sorting (FACS), der er baseret på flowcytometri. Jeg har valgt metoden, fordi det med denne er muligt at sortere levende celler (ThermoFisher 2018), hvilket er en forudsætning for mit forsøg, fordi cellerne også skal være anvendelige efter sorteringen. Det, at cellerne er anvendelige efter sorteringen, er også afgørende i forhold til muligheden for at anvende de færdigdifferentierede celler til behandling af CF.

² Jf. bilag 2

Når man laver en FACS, mærker man først cellerne ved at lave en immunfarvning med et fluorescerende antistof, der kan binde sig til et antigen, der er karakteristisk for de celler, man ønsker at frasortere (ThermoFisher 2018). I mit projekt anvender jeg derfor et SOX9 antistof, der vil binde sig til antigenerne, der er karakteristiske for *SOX9*⁺-celler.

Til at lave selve cellesorteringen anvendes et flowcytometer. Til at starte med placeres en prøve med celler, der er blevet immunfarvet i flowcytometeret. Flowcytometeret leder derefter cellerne enkeltvis gennem et tyndt rør ned til analysepunktet, hvor hver enkelt celle bliver bestrålet med en laserstråle. Lyset fra læserstrålen spredes på en bestemt måde, afhængigt af hvilken type celle der rammes, idet der er forskel på de forskellige typer cellers overfladestruktur. En computer opsamler disse data i et diagram, så man kan analysere antallet af celler, samt hvilke typer af celler der er i prøven. De celler, der er mærket med et fluorescerende antistof, vil lyse op, idet fluorokromerne i antistoffet exciteres og udsender fotoner, når laserstrålen rammer cellen (ThermoFisher 2018).

Dette signal opfanger flowcytometeret også, og alle de celler, der er mærket med fluorescerende antistof, gives en bestemt ladning af flowcytometeret. De mærkede celler, der nu har en bestemt ladning i forhold til de resterende celler i prøven, vil ved hjælp af en metalplade med modsat ladning af de mærkede celler afbøjes fra de umærkede celler i prøven og frasorteres over i et rør for sig selv³ (abcam 2018). På den måde kan man sortere mange celler hurtigt og effektivt, cirka 10.000 per sekund, der herefter kan bruges til videre anvendelse (ThermoFisher 2018).

iPSC fremfor hESC

Jeg har i mit forsøg valgt at anvende iPSC fremfor hESC, som ellers anvendes i Rezania-Kieffer protokollen. Dette skyldes de etiske problematikker, der er i at anvende hESC både til forsøg, men også i forhold til at benytte disse til fremtidige behandlinger af patienter, da der skal menneskefostre til at fremstille hESC fremfor patientens egne hudceller, der kan benyttes til at fremstille iPSC (Hadenfeld, Pusch, Peitz et Bruestle 2018). Derudover vil det være en fordel, at cellerne ligner patienternes egne celler så meget så muligt, hvis de skal anvendes til behandling, da sandsynligheden for, at kroppens immunforsvar angriber dem, dermed er lavere. Det skal noteres, at anvendelsen af iPSC godt kan vise sig at være en fejlkilde i forsøget. Umiddelbart tænker jeg ikke, at dette vil være et problem, da iPSC har samme differentieringsevne og potentiale som hESC (Rezania 2014b, s. 15).

³ Jf. bilag 3

Projektets udførelse

Forsøgsdesign

Jeg har valgt at dele mit forsøg op i syv stadier, hvoraf de fire første stadier er differentieringsprocessen, der følger Rezania-Kiefferprotokollen. Det er vigtigt at nævne, at alle cellerne ikke er differentieret til samme stadie under forsøget, og der derfor ved de forskellige stadier i forsøget kun er en del af cellerne, der vil være differentieret til det ønskede differentieringsstadie.

iPSC dyrkes under hele forsøget i en planar kultur (6-well plade coated med Matrigel), hvor temperaturen holdes på 37°C. Det er vigtigt, at hele forsøget laves under sterile forhold, da der ellers sker forurening af cellerne.

Vækstmediet skal gennem hele forsøget have en koncentration på 10mM glukose, og det skiftes hver dag for at holde cellerne i live. Derudover skal mediet være suppleret med 0,5% FAF-BSA i stadie 1 og 2 og med 2% FAF-BSA og ITS-X (1:200) i stadie 3, 4 og 5 (Rezania 2014b, s. 51), så cellerne får den næring, de har behov for.

Hver brønd i en 6-well plade har et volumen på 16,6mL, jeg regner derfor med, at der skal benyttes 100mL vækstmedie pr. dag.

Det skal noteres, at mit forsøg er et pilotforsøg, der skal teste om differentieringen kan lade sig gøre med følgende metode. Der laves derfor kun prøver i én 6-well plade.

Forberedelse af forsøg:

Inden forsøget startes, forberedes en 6-well matrigel coated plade med vækstmedie DMEM/F-12 indeholdende GlutaMAX supplement, ascorbinsyre (0,25mM), vækstoffaktoren TGF- β (1ng/mL), ITS-X(1:100), FAF-BSA (2%), vækstoffaktoren IGF-1 (20ng/mL) og inhibatoren Y27632 (10 μ M). Pladerne podes med iPSC ($1 \cdot 10^5$ enkelte celler/cm²). (Rezania 2014b, s. 51)

Stadie 1 (3 dage):

I det først stadie differentieres iPSC til definitive endoderme celler. Dette sker ved tilsætning af MCDB vækstmedie indeholdende transskriptionsfaktoren GDF8 (100ng/mL) og GSK3 β inhibitor (1 μ M) (Rezania 2014b s.24).

Stadie 2 (2 dage):

I det andet stadie differentieres de definitive endoderme celler til primitive mavetarmkanalceller. Dette sker ved tilsætning af MCDB vækstmedie indeholdende transskriptionsfaktoren FGF7 (25ng/mL) samt ascorbinsyre (0,25mM) (Rezania 2014b s.25).

Stadie 3 (2 dage):

I det tredje stadie differentieres primitive mavetarmkanalceller til endoderme fortarmsceller. Dette sker ved tilsætning af BLARmedie indeholdende FGF7 (25ng/mL), ascorbinsyre (0,25mM), retinoinisyre(RA) (1 μ M), antagonisten SANT(0,25 μ M), PKC aktivatoren TPB (200nM) og LDN inhibitor (100nM) (Rezania 2014b, s. 26).

Stadie 4 (3 dage):

I det fjerde stadie differentieres de bagvedliggende fortarmsceller til endoderme pancreas celler. Dette sker ved tilsætning BLARmedie indeholdende FGF7 (2ng/mL), ascorbinsyre (0,25mM), RA (100nM), SANT (0,25 μ M), TPB (100nM) og LDN inhibitor (100nM) (Rezania 2014b s. 33).

Stadie 5 (2 dage):

Efter det fjerde stadie stopper jeg med at følge Rezania-Kieffer protokollen. Eksokrine pancreas celler udtrykker genet SOX9. Jeg sorterer derfor de SOX9⁺-celler fra ved hjælp af FACS. Herefter tilsættes nyt BLARmedie til de SOX9⁺-celler, og cellerne får lov at stå 2 dage. Herefter bør en del af dem, ifølge min hypotese spontant have differentieret til eksokrine pancreas ductceller.

Stadie 6:

I det sjette stadie skal jeg teste, om nogle af iPSC har udviklet sig til funktionelle pancreas ductceller. Dette gør jeg ved at tilsætte medium til cellekulturen indeholdende Ca^{2+} . Herefter tages prøver af mediet hvert 10 min. i en time, og koncentrationen af Cl^{-} og HCO_2^{-} måles. Indeholder mediet en højere koncentration af Cl^{-} og HCO_3^{-} end før, virker ionkanalerne, som de skal. Der er altså dermed fremstillet funktionelle pancreas ductceller.

Forsøget forventes samlet med forberedelsen at tage 3 uger.

Budget

Nedenfor ses det forventede budget for forsøget. Alle mængder er efterregnet vha. molberegning, sådan at er nok til at lave de korrekte koncentrationer i mediet i de angivne indkøbsmængder. Derudover er det også værd at nævne, at alle priser, der oprindeligt har været i USD, er omregnet med en kurs på 6,44 (d.16-10-2018).

Materialer	Pris	Forhandler	Catalogue #
iPSC (1VL)	4945kr	Corriel	GM25256
MCDB medie (500mL)	428kr	Invitrogen	10372019
BLAR medie (1L)	≈1000kr	Fremstilles selv	-
Matrigel (5mL)	1062,60kr	Corning	356234
Glukose (100mL)	370,80kr	Sigma-Aldrich	G8769
DMEM/F-12, Gluta-MAX™ Supplement (500mL)	182kr	Invitrogen	31331028
FAF-BSA (10g)	451,7kr	Proliant	68700
ITS-X (10mL)	130kr	Invitrogen	51500056
TGF-β (1μg)	412,2kr	R&D systems	7754-BH
IGF-1 (50μg)	169,74 kr	Sigma-Aldrich	I1146
Y27632 (500μg)	766,8 kr	Sigma-Aldrich	Y0503
GDF8 (30μg)	1278 kr	Peprtech	120-00
GSK3β (1mg)	214 kr	Sigma-Aldrich	B1686
FGF7 (10μg)	1616 kr	R&D systems	251-KG-010/CF
Vitamin C (25g)	183,60 kr	Sigma-Aldrich	A4544
RA (50mg)	324 kr	Sigma-Aldrich	R2625
SANT(1mg)	214 kr	Sigma-Aldrich	S4572
TPB (1mg)	1082 kr.	R&D Systems	5343/1
LDN (5mg)	626,40 kr.	Sigma-Aldrich	SML0559
SOX9 antistof	2865,60 kr.	Sigma-Aldrich	AV37986
Laboratorie med apparaturer mm. lånes af DanSTEM KU.	0 kr		
Løn til studerende der skal assistere mig i forsøget (primært i opstartsfasen og til FACS)	3000kr (aftalt på forhånd, en timeløn på ca. 180 kr/t.)		
I alt	19.799,04 kr.		

Konklusion og perspektivering

Hvis mit forsøg bekræfter min hypotese, om at det er muligt at differentiere funktionelle pancreas ductceller ved hjælp af Reznia-Kieffer protokollen, vil det først og fremmest åbne op for at lave et udvidet forsøg med flere cellekulture og eventuelt forsøg med optimering af differentieringen, så flere celler differentieres til funktionelle pancreas ductceller. Dette kan eventuelt være ved at undersøge hvilke transskriptionsfaktorer, der er ansvarlige for differentiationen af de *SOX9*⁺-celler til pancreas ductceller. Derudover vil det også åbne op for forskning i behandlingsmetoder af CF i pancreas med iPSC, hvilket vil kunne forbedre CF-patienters livskvalitet markant. Det kan også tænkes,

at denne viden om iPSC vil kunne overføres til andre sygdomme i pancreas, som eksempelvis kronisk pancreatitis. Ydermere kan behandlingen af CF i pancreas med iPSC, også tænkes, såfremt den er mulig, at åbne op for anvendelsen af iPSC til behandling af CF i lungerne og tarmepitelet.

Tak

Først og fremmest skal en stor tak lyde til min forskerkontakt Mette Christine Jørgensen, stabsforsker på DanSTEM, Københavns Universitet, for vejledning gennem projektet. Tak til min bioteknologilærer og koordinator Mårten Flø Jørgensen for støtte og opbakning gennem projektet og for tålmodighed og hjælpsomhed når frustrationerne ramte. Derudover skal der også lyde en tak til mine medspirer for sparring og gode råd i løbet af projektet.

Litteraturliste

Forskningsartikler

Wilschanski, M. et Novak, I. *The Cystic Fibrosis of Exocrine Pancreas*. Maj 2013. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2013;3:a009746.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3633181/pdf/cshperspectmed-CYS-a009746.pdf>

Firth, A. L., Menon, T., Parker, G. S., Qualls, S. J., Lewis, B. M., Ke, E., Dargitz, C. T., Wright, R., Khanna, A., Gage, F. H. et Verma¹, I. M. *Functional Gene Correction for Cystic Fibrosis in Lung Epithelial Cells Generated from Patient iPSCs*. 01-09-2015. *Cell Reports*12, 1385–1390.

<https://www.cell.com/action/showPdf?pii=S2211-1247%2815%2900852-9>

Rezania, A., Bruin, J. E., Arora, P., Rubin, A., Batushansky, I., Asadi, A., O'Dwyer, S., Quiskamp, N., Mojibian, M., Albrecht, T., Yang, Y. H. C., Johnson, J. D., Kieffer, T. J. *Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells*. *Nature Biotechnology*, 11-09-2014 (a).

Rezania, A. *Culturing of Human Embryonic Stem Cells at The Air-liquid Interface for Differentiation into Pancreatic Endocrine Cells*. 03-07-2014 (b).

<https://patentimages.storage.googleapis.com/bb/b0/46/f1b543713fc004/WO2014105543A1.pdf>

Netartikler/hjemmesider:

Borg, Morten. Cystisk Fibrose (senest besøgt 25-10-2018):

<https://www.netdoktor.dk/sygdomme/fakta/cystiskfibrose.htm>

Stanford Medicine. The Basics of CF (senest besøgt 18-10-2018):

<https://med.stanford.edu/cfcenter/education/english/BasicsOfCF.html>

Uniprot. CFTR_HUMAN (senest besøgt 18-10-2018):

<https://www.uniprot.org/uniprot/P13569>

Abcam. Fluorescence activated cell sorting of live cells (senest besøgt 25-10-2018):

<https://www.abcam.com/protocols/fluorescence-activated-cell-sorting-of-live-cells>

ThermoFisher. How a flow cytometer works (senest besøgt 25-10-2018):

<https://www.thermofisher.com/dk/en/home/life-science/cell-analysis/cell-analysis-learning-center/molecular-probes-school-of-fluorescence/flow-cytometry-basics/flow-cytometry-fundamentals/how-flow-cytometer-works.html>

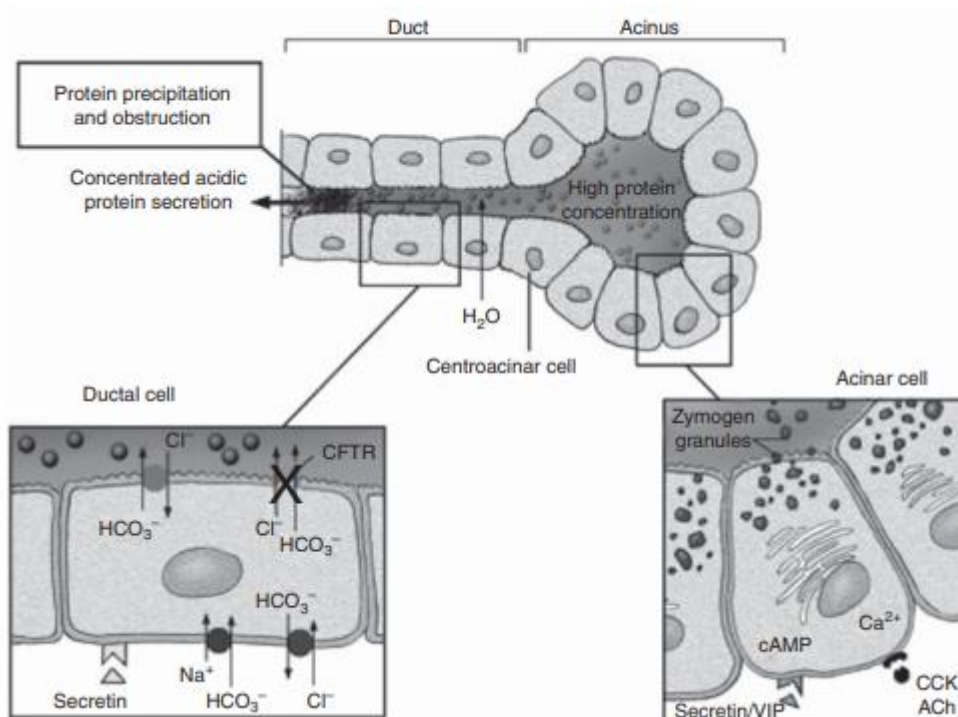
Hadenfeld, M., Pusch, A., Peitz, M. et Bruestle, O. iPS cells and reprogramming: turn any cell of the body into a stem cell. (senest besøgt 25-10-2018):

<https://www.eurostemcell.org/ips-cells-and-reprogramming-turn-any-cell-body-stem-cell>

Bilag

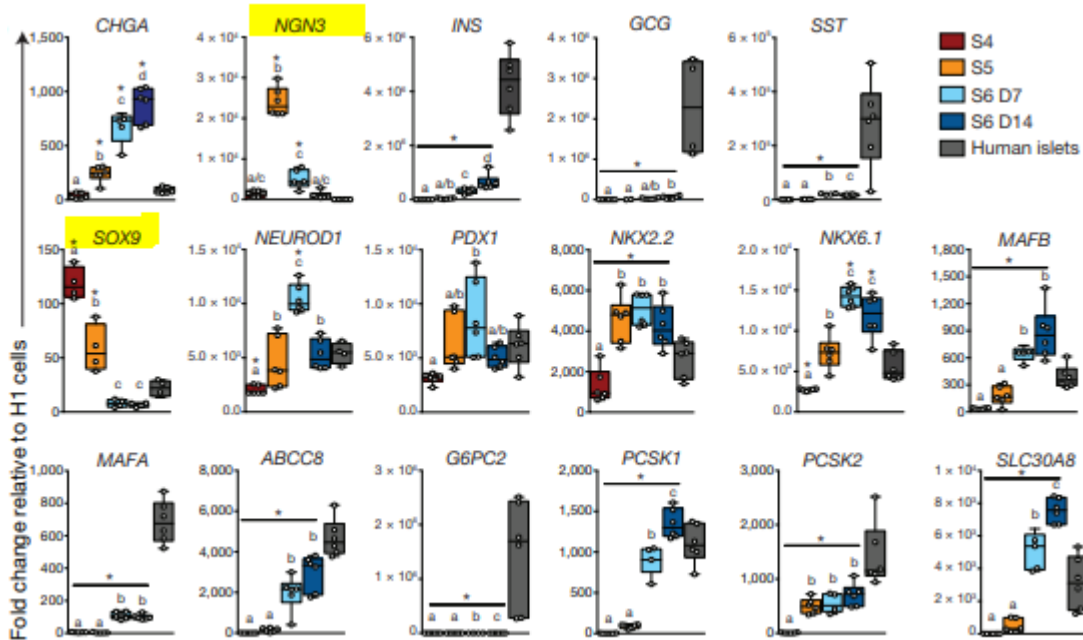
Bilag 1:

Figur der viser en duct i pancreas hos en patient med cystisk fibrose (Wilschanski et Novak 2013). Som det ses, er de ineffektive ionkanaler skyld i, at ductene bliver blokeret af ophobninger af fordøjelsesenzymer.



Bilag 2:

Figur fra (Rezania et al. 2014a), der blandt andet viser målingerne af *SOX9*⁺-celler og *NGN3*⁺-celler i de forskellige differentieringsstadier i Rezania-Kieffer protokollen for differentiering af endokrine pancreas celler fra hESC.



Bilag 3:

Figuren (Abcam 2018) viser princippet i FACS. Som det ses, medfører de mærkede cellers forskellige ladninger, at de sorteres fra de ikke mærkede celler.

