

# VIB-onderzoek in focus

01  
2005

*VIB spitst een groot deel van zijn onderzoek toe op het ontcijferen van moleculaire levensmechanismen. Wij willen u graag op de hoogte houden van onze belangrijkste wetenschappelijke doorbraken.*

*Hier nemen we één van de vele succesvolle onderzoekstopics van Peter Carmeliet en zijn team onder de loep: de rol van VEGF in neurodegeneratie.*

*Veel leesplezier!*

*VIB-Communicatie  
info@vib.be*

## Peter Carmeliet

### De onverwachte rol van VEGF in de behandeling van Amyotrophische Laterale Sclerose (ALS)



Men weet van VEGF (Vasculaire Endotheliale GroeiFactor) dat het onmisbaar is bij de aanmaak van bloedvaten. Recent onderzoek toont nu aan dat deze molecule bescherming biedt tegen motorneuronverlies en bevestigt zo het verband tussen bloedvaten en zenuwcellen. VIB-wetenschapper Peter Carmeliet en zijn team hebben aangetoond dat VEGF een hoofdrol speelt in de neurodegeneratieve ziekte Amyotrophische Laterale Sclerose (ALS, of de ziekte van Lou Gehrig).

Angiogenese – de aanmaak van nieuwe bloedvaten – is een essentieel proces tijdens de ontwikkeling van een embryo en tijdens weefselvernieuwing bij zwangerschap of wondheling. Abnormale angiogenese

staat in verband met heel wat ziektes: overdreven angiogenese vergemakkelijkt bijvoorbeeld de ontwikkeling van kanker en ontstekingsziektes; onvoldoende angiogenese leidt tot een verminderde bloedtoevoer naar weefsels.

#### Breng je VEGF tot uitdrukking!

Vervolgens spitte het team zich toe op de verhoogde aanmaak van VEGF ten gevolge van hypoxie, of een gebrek aan zuurstof. Hypoxie stimuleert cellen om VEGF aan te maken. Dit leidt

## ‘De toediening van recombinante VEGF-eiwitten biedt een onverwacht therapeutisch effect.’ (Peter Carmeliet)

Peter Carmeliet en zijn team van het VIB-departement Transgene Technologie en Gentherapie (K.U.Leuven) interesseren zich al lang voor de rol van VEGF bij angiogenese, zowel tijdens de ontwikkeling als bij ziekte.

Medio de jaren 1990 onderzocht Carmeliets team de functies van VEGF *in vivo* door het VEGF-gen bij muizen te verwijderen. Tot hun verbazing leidde

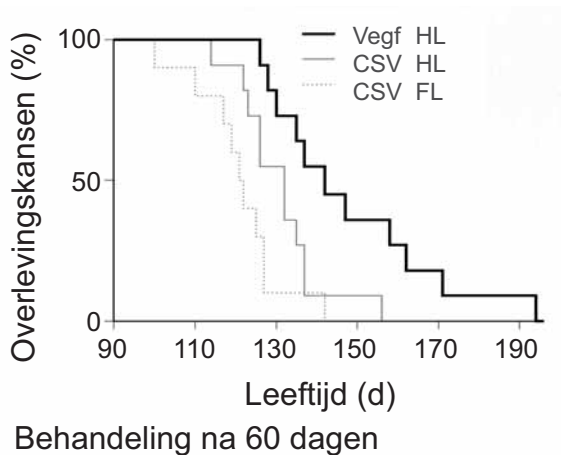
tot een verhoogde angiogenese en weefselinfusie, waardoor de zuurstoftoevoer naar de cellen wordt hersteld.

Om het fysiologische belang van deze VEGF-productie na te gaan, ontwikkelde Carmeliets team een VEGF<sup>Δ/Δ</sup>-knock in muismodel. Ze verwijderden het hypoxieresponselement uit de VEGF-promotor, een sequentie van 28-baseparen die bindt met transcriptiefactoren die door hypoxie geïnduceerd kunnen worden.

De VEGF<sup>Δ/Δ</sup>-muizen waren levensvatbaar, maar vertoonden, opnieuw geheel onverwacht, verlamingsverschijnselen zodra ze volwassen waren. Carmeliet: ‘We stonden allemaal versteld over het feit dat volwassen VEGF<sup>Δ/Δ</sup>-muizen zich niet konden bewegen in hun kooien en tekenen van verlamming vertoonden. We moesten dus zien uit te vinden wat er misging met deze muizen.’

Carmeliet en zijn team ontdekten dat de VEGF<sup>Δ/Δ</sup>-muizen te kampen hadden met een ernstige spierverswakking die veroorzaakt werd door een progressieve degeneratie van motorneuronen in het ruggenmerg en de hersenstam. Tegelijkertijd stelden de onderzoekers meerdere overeenkomsten vast tussen het VEGF<sup>Δ/Δ</sup>-fenotype en de neuropathologische en klinische kenmerken van mSOD1G93A transgene muizen en ALS-patiënten (Oosthuyse *et al.*, *Nature Genetics*, 2001).

ALS is een ongeneeslijke, verlamme, neurodegeneratieve ziekte die vaak gezonde mensen treft in de meest actieve periode van hun leven, zonder voorafgaande symptomen of precedenten in de familie. Bij ALS-patiënten takelen de motorneuronen geleidelijk af. Dit leidt tot een progressieve verzwakking van de spieren die de spraak, het slikken, de motoriek en het ademen controleren. Patiënten waarbij de aandoening wordt vastgesteld, worden lam. Ze sterven door ademhalingsproblemen binnen 3 tot 5 jaar na



Een VEGF-behandeling verhoogt de overlevingskansen van ALS-ratmodellen. De controledieren worden ingespoten met cerebrospinale vloeistof (CSV), ze vertonen tekenen van ALS in de voorste (FL) en in de achterste (HL) ledematen. De behandelde dieren vertonen enkel in de achterste ledematen tekenen van ALS en leven langer.

de verwijdering van slechts één enkel VEGF-allel tot een voortijdige embryonale dood. Dit was het gevolg van ernstige vasculaire defecten op het moment dat angiogenese een cruciale rol speelt in de embryonale ontwikkeling (Carmeliet *et al.*, *Nature*, 1996). ‘Dit resultaat hadden we helemaal niet verwacht’ zegt Carmeliet, ‘Het was het eerste voorbeeld van zo’n ernstig haploinsufficiënt fenotype, maar bewijst wel de sleutelrol van VEGF bij angiogenese.’

het stellen van de diagnose. Voor een klein deel familie ALS-gevallen vond men een verantwoordelijk gen (superoxide dismutase, SOD), maar voor het leeuwendeel van de meest voorkomende toevallige vorm van de ziekte blijft de etiologie een raadsel.

#### VEGF en motorneurondegeneratie

De ontdekking van het feit dat VEGF wel eens een rol zou kunnen spelen in motorneurondegeneratie bij muizen, was zo onverwacht dat het team met experimenten startte om aan te tonen dat VEGF een gelijkaardige rol speelt bij mensen. Daaruit bleek dat ALS-patiënten beduidend minder VEGF aanmaken. Uit de genotypering van drie veel voorkomende variaties in de promotor en het 5' - onvertaalde - gebied van het VEGF-gen van ALS-patiënten, werd duidelijk dat er twee risicogenotypes bestaan die de kans op ALS aanzienlijk verhogen. Dit was voor de onderzoekers het eerste bewijs van een moleculair verband tussen de aanmaak van VEGF en ALS (Lambrechts *et al.*, *Nature Genetics*, 2003).

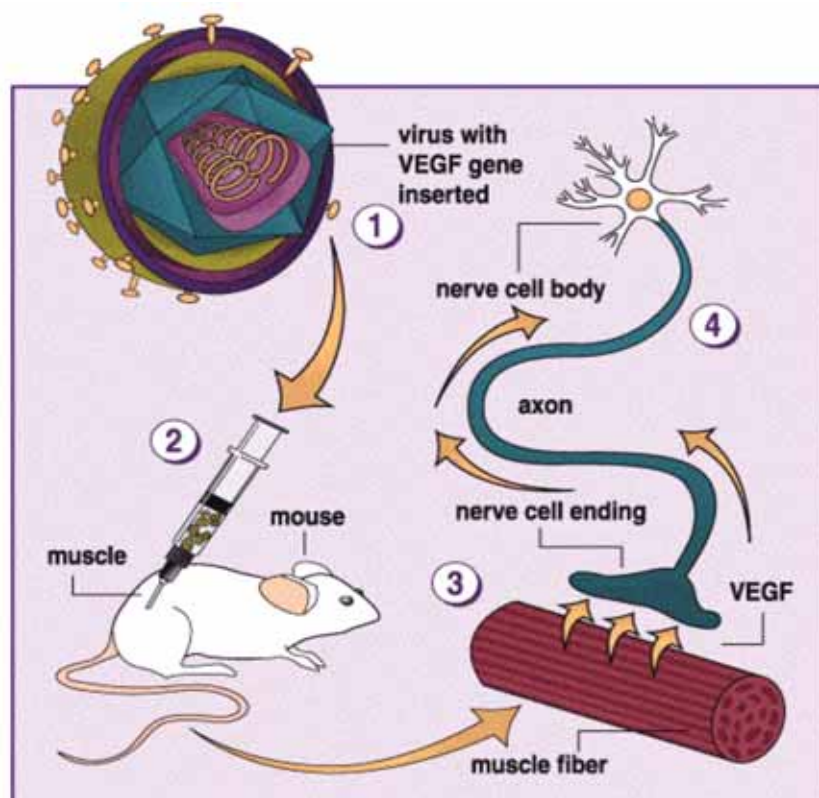
Bij het *in vitro* onderzoek naar de invloed van deze risicogenotypes, werd duidelijk dat ze de aanmaak van VEGF met bijna de helft verminderden. De genotypering van meer dan 700 ALS-patiënten en doorgedreven controles in het kader van de grootste studie die destijds binnen de ALS-liga werd

uitgevoerd, brachten aan het licht dat personen met een risicogenotype nagenoeg twee keer zoveel kans lopen om de ziekte te ontwikkelen. Dit bewijst dat VEGF een belangrijk gen is in de motorneurondegeneratie bij menselijke ALS. De onderzoekers kwamen eveneens tot de vaststelling dat bij kruising van een standaard muismodel voor ALS (mSOD1G93A) met het VEGF<sup>Δ/Δ</sup>-muismodel, de ALS-symptomen sterker zijn in de dubbel-transgene muizen. Deze muizen vertonen vroeger spierzwakte door motorneuronverlies en ze hebben een kortere levensduur.

#### Het therapeutische potentieel van VEGF

Nu er een duidelijk verband was aangetoond tussen VEGF en ALS, konden de onderzoekers experimenten opzetten om het therapeutische potentieel van VEGF als nieuwe ALS-behandeling, te bepalen. Het eerste positief resultaat was de bescherming tegen motorneuronverlies die de toediening van VEGF bood aan gezonde muizen in stress-situaties.

In samenwerking met het Britse biotechnologiebedrijf Oxford Biomedica, ontdekte Carmeliet team dat één enkele injectie met een lentivirale vector verantwoordelijk voor de aanmaak van VEGF, het begin van de ziekte uitstelt en de ontwikkeling van motorneurondegeneratie



Eén enkele injectie in verschillende spieren met een lentivirale vector die VEGF aanmaakt, stelt het begin van de ziekte uit en vertraagt de ontwikkeling van motorneurondegeneratie in het gemuteerde muismodel. De deeltjes (1) die worden ingespoten in de spieren van de muizen (2) worden van de spiercellen (3) overgebracht naar de zenuwcellen (4) waar ze instaan voor een betere overlevingskans van de cellen.

(Met dank aan de Muscular Dystrophy Association, [www.mdausa.org](http://www.mdausa.org) voor de illustratie)



vertraagt in het mSOD1G93A muismodel. Het meest opmerkelijke is wel dat de VEGF-behandeling de levensverwachting van de ALS-muizen met 30% verhoogt zonder toxische neveneffecten (Azzouz *et al.*, *Nature*, 2004). Carmeliet: 'Dit experiment bewees voor het eerst dat de toediening van VEGF de overlevingskansen van preklinische ALS-diermodellen aanzienlijk kan vergroten.'

## 'VEGF oefent zijn positieve effecten blijkbaar uit door de motorneurondegeneratie in de hersenstam en het ruggenmerg te vertragen.'

Deze beloftevolle resultaten met gentransfer bewezen de gunstige rol die VEGF speelt bij ALS, toch blijft de klinische bruikbaarheid van VEGF-gentherapie voor ALS nog onzeker. Een alternatief is de toediening van een recombinant VEGF-eiwit met als belangrijkste voordeel dat de duur en dosering van de VEGF-toediening controleerbaar zijn.

Carmeliet en zijn collega's lieten zich niet afschrikken door het mislukken van vorige klinische proeven met eiwittoediening van neurotrophines. Ze optimaliseerden de weg, de dosering en de duur van de toediening van recombinant VEGF. Ze kwamen tot de vaststelling dat een voortdurende intracerebroventriculaire toediening via osmotische minipompjes het begin van de ziekte uitstelde en de motorperformantie verbeterde in twee ratmodellen, één met een ernstige vorm van ALS en één met een mildere vorm. Het belangrijkste was dat de onderzoekers aantoonde dat VEGF de overlevingskansen van de ratten aanzienlijk kon vergroten. Dit was zo wanneer de behandeling werd gestart voor de ziekte of bij aanvang ervan. Deze ontdekking was uitermate relevant in het kader van een mogelijk klinisch gebruik van VEGF bij menselijke patiënten (Storkebaum *et al.*, *Nature Neuroscience*, 2005).

'Dit is de eerste keer dat aangetoond wordt dat de toediening van neurotrophische eiwitten de overlevingskansen van ALS-knaagdiermodellen aanzienlijk verhoogt,' zegt Carmeliet. 'Het therapeutische effect van de toediening van VEGF-eiwitten is het meest veelbelovende binnen dit onderzoeksgebied.'

Met hun laatste publicatie, waarin ze gewag maken van hun veelbelovende preklinische resultaten, maken Carmeliet en zijn collega's de weg vrij voor de start van klinische proeven met VEGF bij de behandeling van ALS-patiënten.

### Referenties

Carmeliet P, Ferreira V, Breier G, Pollefeyt S, Kieckens L, Gertsenstein M, Fahrig M, Vandenhoeck A, Harpal K, Eberhardt C, Declercq C, Pawling J, Moons L, Collen D, Risau W, Nagy A  
Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele.  
*Nature* 380, 435-439, 1996.

Ferrara N, Carver-Moore K, Chen H, Dowd M, Lu L, O'Shea KS, Powell-Braxton L, J. Hillan K, W. Moore M  
Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene.  
*Nature* 380, 439-442, 1996.

Oosthuysen B, Moons L, Storkebaum E, Beck H, Nuyens D, Brusselmans K, Van Dorpe J, Hellings P, Gorselink M, Heymans S, Theilmeier G, Dewerchin M, Laudénbach V, Vermynen P, Raat H, Acker T, Vleminckx V, Van Den Bosch L, Cashman N, Fujisawa H, Drost MR, Sciot R, Bruyninckx F, Hicklin DJ, Ince C, Gressens P, Lupu F, Plate KH, Robberecht W, Herbert JM, Collen D, Carmeliet P  
Deletion of the hypoxia-response element in the vascular endothelial growth factor promoter causes motor neuron degeneration.  
*Nat Genet.* 28, 131-138, 2001.

Lambrechts D, Storkebaum E, Morimoto M, Del-Favero J, Desmet F, Marklund SL, Wyns S, Thijs V, Andersson J, van Marion I, Al-Chalabi A, Bornes S, Musson R, Hansen V, Beckman L, Adolfsson R, Pall HS, Prats H, Vermeire S, Rutgeerts P, Katayama S, Awata T, Leigh N, Lang-Lazdunski L, Dewerchin M, Shaw C, Moons L, Vlietinck R, Morrison KE, Robberecht W, Van Broeckhoven C, Collen D, Andersen PM, Carmeliet P  
VEGF is a modifier of amyotrophic lateral sclerosis in mice and humans and protects motoneurons against ischemic death.  
*Nat Genet.* 34, 383-394, 2003.

Azzouz M, Ralph GS, Storkebaum E, Walmsley LE, Mitrophanous KA, Kingsman SM, Carmeliet P, Mazarakis ND  
VEGF delivery with retrogradely transported lentivector prolongs survival in a mouse ALS model.  
*Nature* 429, 413-417, 2004.

Storkebaum E, Lambrechts D, Dewerchin M, Moreno-Murciano MP, Appelmans S, Oh H, Van Damme P, Rutten B, Man WY, De Mol M, Wyns S, Manka D, Vermeulen K, Van Den Bosch L, Mertens N, Schmitz C, Robberecht W, Conway EM, Collen D, Moons L, Carmeliet P  
Treatment of motoneuron degeneration by intracerebroventricular delivery of VEGF in a rat model of ALS.  
*Nat Neurosci.* 8, 85-92, 2005.