

**Hubrecht laboratorium moet wiel opnieuw uitvinden**

# Stamcellen kloppend maken

*Door Els van den Brink, gepubliceerd in het Laboratorium Magazine van April 2007*

**Werken met stamcellen uit menselijke embryo's is een vak apart. Veel standaard technieken blijken bij deze cellen niet zomaar te werken. Maar met nieuw ontwikkeld gereedschap is er uiteindelijk veel mogelijk, zo blijkt bij een bezoek aan het Utrechtse Hubrecht Laboratorium.**

Onderzoekers van menselijke, embryonale stamcellen bewegen zich in alle opzichten aan de grenzen van de wetenschap. Enerzijds zijn stamcelonderzoekers gebonden aan de ethische grenzen via de regels van de Embryowet (zie kader). Volgens sommigen wordt het onderzoek te veel begrensd door die wet, volgens anderen zou het nog wel strikter mogen. Anderzijds lopen stamcelonderzoekers ook tegen technische grenzen aan. Kweken van stamcellen uit menselijke embryo's is pas mogelijk sinds 1998 en de ervaring die er al was met stamcellen uit muizenembryo's bleek grotendeels onbruikbaar voor de menselijke variant. Christine Mummery, professor ontwikkelingsbiologie aan het Hubrecht Laboratorium KNAW in Utrecht, vertelt: "Bij bijna alles wat we willen doen, moeten we opnieuw het wiel uitvinden. Heel veel gereedschap moeten we zelf ontwikkelen." Niet zonder succes. Dankzij dat nieuwe gereedschap lukt het sinds 2001 om humane, embryonale stamcellen te laten uitgroeien tot hartcellen.

## Potentie

Embryonale stamcellen zijn afkomstig van een embryo van enkele dagen oud. Ze hebben de potentie om uit te groeien tot elke mogelijke lichaamscel, in totaal 220 denkbare celtypen. Dat is veel meer dan de potentie van volwassen stamcellen uit bijvoorbeeld beenmerg (zie kader). Embryonale stamcellen hebben niet alleen die potentie om zich te differentiëren, ze hebben ook sterk de neiging om daar direct mee te beginnen. Bij het kweken van stamcellen komt het er op aan om dat te voorkomen. Dat kan door de cellen te groeien in aanwezigheid van fibroblasten, bindweefselcellen. Sommige cellijnen groeien op humane fibroblasten, anderen op fibroblasten van muizen. "De eerste cellijnen werden gegroeid op muizenfibroblasten, omdat men niet beter wist", vertelt Mummery. "Later ontdekte men dat het ook mogelijk is humaan materiaal te gebruiken. Nu kweken we cellijnen parallel onder beide condities, dan kunnen we uitzoeken of ze zich hetzelfde gedragen. Alle cellen in kweek zijn namelijk gestresst. Bij te veel stress is er kans op chromosoomafwijkingen."

## Mediumkeuze

Door de noodzakelijke aanwezigheid van fibroblasten en serum is de samenstelling van de voedingsbodem nooit helemaal hetzelfde. Bij stamcellen uit muizenembryo's is ondertussen bekend welke stoffen uit de fibroblasten en het serum nu werkelijk vereist zijn voor de groei. Daardoor kunnen onderzoekers de muizenstamcellen nu groeien in een compleet gedefinieerd medium, de vloeistof waarin de cellen groeien, zonder fibroblasten en serum. Maar de stoffen die voor muizenstamcellen zo'n belangrijke rol spelen, blijken bij menselijke stamcellen een heel andere functie te hebben. De humane stamcellen kunnen al wel een korte periode groeien zonder fibroblasten, maar niet langer dan enkele weken.

In het laboratorium van Christine Mummery zijn verschillende analisten continue bezig met de stamcellenkweek. "Het is vrij arbeidsintensief en vereist veel kweekvaardigheid, een accurate uitvoering van het protocol en een precieze timing.", legt Mummery uit. "Wat vaak misgaat, is dat mensen onvoldoende infrastructuur hebben. Je moet een paar mensen hebben die een ploeg

kunnen vormen.” Die zijn onmisbaar, omdat de kweek dagelijks verversd moet worden, dus ook in de weekenden en vakanties. Tussentijds moet de samenstelling en activiteit van alle componenten in de voedingsbodem regelmatig gecontroleerd worden. Elke nieuwe batch kan net even anders van samenstelling zijn en bovendien gaat bij sommige stoffen de werkzaamheid achteruit tijdens de bewaarperiode in de vriezer.

### **Kloppende factoren**

Mummery's doel is om ongedifferentieerde stamcellen te laten uitgroeien tot hartcellen. Dat bleek uiteindelijk relatief eenvoudig, door de stamcellen te laten groeien in aanwezigheid van endodermcellen uit embryonale muizendarmen. Na een dag of twaalf heeft een deel van de stamcellen zich dan gedifferentieerd tot kloppende hartspiercellen. Geconditioneerd medium heeft hetzelfde effect, ontdekte Mummery later. Dat is vloeistof waarin endodermcellen gegroeid zijn, en waarin ze allerlei stoffen hebben uitgescheiden. Met HPLC en proteomics probeert Mummery met haar collega's deze stoffen nu te identificeren en vervolgens te kijken wat hun effect is op de differentiatie van de stamcellen. Daarmee heeft ze al een aantal essentiële factoren ontdekt. In eerste instantie voegt Mummery deze factoren toe aan het bestaande groeimedium, om zo de differentiatie verder te optimaliseren. “We kunnen nu kweken maken waarin vijftwintig procent van de cellen cardiomyocyt (*hartspiercellen, red.*) is”, vertelt Mummery trots. Maar de losse factoren kunnen het effect van de endodermcellen nog niet evenaren. “Ik denk dat we daarmee ongeveer de helft van het normale resultaat bereiken”, schat Mummery.

### **Harttransplantatie**

De meest aansprekende toepassing van deze hartcellen is de therapeutische transplantatie bij hartpatiënten, bijvoorbeeld na een hartinfarct. Maar daarvoor zijn nog zoveel obstakels, dat Mummery zich afvraagt of ze de uiteindelijke realisatie zelf zal meemaken. Een probleem is bijvoorbeeld dat de hartspiercellen moeten worden gezuiverd van andere soorten gedifferentieerde cellen. Mummery legt uit: “Die andere cellen gaan allemaal dood na transplantatie, dus eigenlijk is hun aanwezigheid helemaal geen probleem. Maar volgens de EU richtlijnen moet je van alles kunnen zeggen wat er in het lichaam mee gebeurt, en dat weten we niet.” Van de hartcellen zelf kan ze dat overigens ook nog niet goed zeggen, in ieder geval niet bij patiënten. Bij proefdieren kunnen onderzoekers de hartcellen door genetische manipulatie fluorescent labelen, maar dat is bij patiënten geen optie. Vandaar dat men hard op zoek is naar een markeringseiwit dat al van nature aanwezig is in de hartcellen. Tenslotte is het nog de vraag hoe men stamcellen in zulke grote hoeveelheden als nodig is voor transplantatie - één miljard cellen per patiënt - kan opkweken.

### **Serieuze kandidaat**

Mummery richt haar verwachtingen daarom vooral op haar andere tak van onderzoek, waar ze probeert om een link te leggen tussen de genen die een rol spelen bij de hartceldifferentiatie en (nog onbekende) genetische afwijkingen die hartafwijkingen bij mensen veroorzaken. Met behulp van microarrays bekijken Mummery en haar collega's welke genen meer of minder worden afgelezen tijdens de differentiatie van stamcellen tot hartcellen. Die informatie leggen ze naast een database van Barbara Mulder, hoogleraar cardiologie bij het AMC. Daarin is het DNA opgenomen van achtduizend patiënten met een hartafwijking. Vinden ze een overeenkomst, dan bekijken de onderzoekers ter controle bij een proefdier wat het effect is van een afwijking in de gevonden genen. Mummery: “Op die manier hebben we nu een serieuze kandidaat gevonden, waarvan we nu nog moeten bevestigen dat die inderdaad een rol speelt bij de hartceldifferentiatie.”

## Ziektemodel

Ook voor bekende genetische afwijkingen kan stamcelonderzoek van betekenis zijn. Mummery richt zich bijvoorbeeld op een afwijking in de ionenkanalen, die zorgen voor de elektrische signalen door de hartspiercellen. Patiënten met die afwijking overlijden vaak al op jonge leeftijd. Mummery is bezig om embryonale stamcellen te creëren met net zo'n genetische afwijking als deze patiënten. Ze wil deze cellen gebruiken als een soort ziektemodel. Daarmee kan ze bekijken wat er precies gebeurt onder verschillende omstandigheden en wat het effect is van verschillende bestanddelen uit voeding en preventieve medicijnen.

## Koksgeheim

Bovenstaand voorbeeld illustreert de eerdere opmerking van Mummery over het nieuw te ontwikkelen gereedschap. Terwijl genetische manipulatie bij veel organismes al een standaardtechniek is en bij stamcellen uit muizenembryo's al twintig jaar wordt toegepast, bleek dat bij humane embryonale stamcellen minder eenvoudig. "Voor elke cellijn was er een ander protocol nodig, ieder met een lage efficiëntie", vertelt Mummery. "We hebben er vrij veel energie ingestoken om überhaupt genen erin te krijgen. Nu hebben we drie verschillende cellijnen waar dat lukt met een efficiëntie van vijfennegentig procent. Dat was een jaar geleden onmogelijk." Maar hoe dat gebeurt? "Dat is het geheim van de kok."

### Embryonale of volwassen stamcellen?

Elk orgaan in het menselijk lichaam beschikt over eigen stamcellen, die zich kunnen ontwikkelen tot de verschillende celtypen die in dat orgaan nodig zijn. Het gaat dan om volwassen stamcellen, waarvan de mogelijkheden dus beperkter zijn dan van embryonale stamcellen. Bekende bronnen zijn beenmerg, vet en navelstrengbloed. Ook het hart beschikt over stamcellen, die kunnen uitgroeien tot hartspiercellen. Onderzoekers in het UMCU hebben onlangs laten zien dat het mogelijk is om die te isoleren via een biopt. Veel onderzoekers zijn op zoek naar nieuwe bronnen van stamcellen met meer mogelijkheden. Anderen proberen de potentie van volwassen stamcellen te verhogen door genetische modificatie. Ondanks de beperkingen hebben volwassen stamcellen wel enkele voordelen ten opzichte van embryonale stamcellen. Zo kunnen ze van de patiënt zelf geïsoleerd worden, waardoor er geen afstotingsverschijnselen ontstaan. Bovendien is er bij embryonale stamcellen soms het risico op tumorvorming, als er nog ongedifferentieerde stamcellen aanwezig zijn. Bovenal hebben deze volwassen stamcellen vaak de voorkeur vanwege ethische redenen.

### Ethisch en wettelijk verantwoord?

Stamcelonderzoek is niet los te zien van alle ethische discussies die ermee samenhangen. Centraal staat de vraag of menselijke embryo's wel gebruikt mogen worden voor wetenschappelijk onderzoek en hoe die gecreëerd moeten worden. Op dit moment is het volgens de Embryowet in Nederland niet toegestaan om embryo's speciaal te kweken voor onderzoek, maar het is wel toegestaan om restembryo's van IVF te gebruiken, als de ouders daarmee instemmen. In principe is dit verbod op het kweken van embryo's tijdelijk, waarbij de regering voor 1 september 2007 moet besluiten wanneer het zal vervallen. Maar volgens het nieuwe regeerakkoord blijft het verbod voorlopig nog op dezelfde manier gehandhaafd. Volgens hetzelfde moratorium is het verboden om te kloneren. Het inbrengen of aanpassen van genen door genetische modificatie in stamcellen is echter wel toegestaan voor wetenschappelijk onderzoek.