

Stamcellen op bestelling

De toevoeging van vier genen kan volwassen menselijke huid- of bloedcellen omvormen tot stamcellen die kunnen uitgroeien tot elk gewenst celtype. Het LUMC in Leiden is gestart met een speciale faciliteit die deze ontdekking benut, om onderzoekers te voorzien van stamcellen gemaakt van patiëntenmateriaal.

Door Els van den Brink, gepubliceerd in het Laboratorium Magazine van mei 2011

Hoe onderzoek je de werking van medicijnen tegen een erfelijke hartritmestoornis, als je niet beschikt over hartcellen van een patiënt met deze aandoening? Tot voor kort waren de mogelijkheden hiervoor beperkt, maar een nieuwe technologie biedt tegenwoordig unieke kansen. Volwassen huid- of bloedcellen zijn door toevoeging van slechts vier genen om te vormen tot pluripotente stamcellen, die zich kunnen differentiëren tot elk gewenst celtype. Een stukje huid van een patiënt kan zo worden omgetoverd tot hartspiercellen, waarin een hartritmestoornis duidelijk zichtbaar is en het effect van medicijnen nauwkeurig kan worden onderzocht.

Stamcelservice

De Japanse professor Yamanaka ontdekte in 2007 dat hij menselijke lichaamscellen kon herprogrammeren tot *induced pluripotent* stamcellen (iPS-cellen). Hij kon de cellen zo veranderen, dat ze vergelijkbaar werden met embryonale stamcellen, die de potentie hebben om uit te groeien tot elke willekeurige lichaamscel. De ontdekking van Yamanaka heeft zoveel impact, dat zijn naam al veel genoemd wordt als mogelijke Nobelprijswinnaar. Onderzoekers van het LUMC maakten in 2008 de eerste iPS-cellen van Nederland. Inmiddels is het maken van dergelijke cellen voor hen zo'n routine geworden, dat LUMC-onderzoekers Harald Mikkers en Christian Freund samen met hun sectieleiders besloten om dit als service te gaan aanbieden in een speciale iPS-faciliteit. "Het maken van iPS-cellen is niet heel moeilijk, maar ook geen sinecure", verklaart Mikkers. "Het is nog wel veel werk, we hebben drie maanden nodig om een iPS-cellijn te kunnen leveren. Maar we slagen er bijna altijd in", vult Freund aan.

"We zijn in februari 2011 van start gegaan en verschillende afdelingen binnen het LUMC zijn al geïnteresseerd", vertelt Freund. "In principe werken we alleen voor het LUMC, maar als we ruimte over hebben, kunnen we ook stamcellen maken voor andere onderzoeksgroepen."

Drempelvrees

Mikkers: "We merken dat er nog veel drempelvrees is. Het werken met pluripotente stamcellen is arbeidsintensief en vergt een zekere investering. Het is een sprong in het diepe. Tegelijkertijd biedt het unieke mogelijkheden. Voor onderzoek naar een syndroom ben je nu niet meer beperkt tot onderzoek in de patiënt zelf, in proefdieren of materiaal van een overleden patiënt. iPS-cellen bieden voor het eerst de mogelijkheid van humane ziektemodellen. Hiermee kun je je onderzoek in een kweekschaaltje uitvoeren, en net zo lang vers materiaal maken als nodig is."

De capaciteit van de nieuwe iPS-faciliteit is beperkt. "We kunnen twintig tot dertig cellijnen per jaar maken. Dat betekent dat we per ziektebeeld voor hooguit twee patiënten een cellijn kunnen maken", zegt Mikkers.

Om onderzoekers op weg te helpen, bieden Mikkers en Freund een speciale cursus aan. Mikkers vertelt: “iPS-cellen zijn een heel speciaal celtype. Zonder ervaring ben je de ongedifferentieerde stamcellen snel weer kwijt. Tijdens onze cursus leren wij mensen de basis van het kweken van stamcellen. Daarna bieden we een follow-up, waarbij we mensen ondersteuning geven, bijvoorbeeld bij het vinden van de juiste protocollen.”

Bloedvatcellen

In principe kan elke willekeurige lichaamscel worden hergeprogrammeerd tot een pluripotente stamcel, maar in de praktijk zijn er wel beperkingen. “Het is belangrijk dat de cellen makkelijk zijn te isoleren en goed in kweek gehouden kunnen worden”, legt Mikkers uit. Vandaar dat in de praktijk meestal huidcellen worden gebruikt. “Sinds kort kunnen we ook iPS-cellen maken uit bloedvatcellen die in het bloed circuleren. Daarvoor hebben we tien tot twintig milliliter bloed nodig. Dat is voor patiënten nog minder belastend”, vertelt Freund. Hij illustreert daarmee gelijk op wat voor manier de iPS-faciliteit bezig is met verbetering van de technologie. “We gaan niet zelf dingen uitvinden, maar implementeren wel zaken die wereldwijd worden ontwikkeld”, verklaart hij.

Herprogrammeren

In feite is er weinig voor nodig om het herprogrammeren van een lichaamscel in gang te zetten. De onderzoekers nemen de genen van vier transcriptiefactoren die ze met behulp van een virus in de cel brengen. “Deze genen komen ook al voor in het DNA van de lichaamscellen, maar daar zijn ze niet meer actief. Door het inbrengen via een virus zorgen wij ervoor dat deze genen opnieuw tot overexpressie komen”, verklaart Mikkers. Wat er vervolgens precies gebeurt in deze cellen, is niet helemaal duidelijk. Zeker is wel dat door deze ingebrachte transcriptiefactoren een heel netwerk van andere genen wordt geactiveerd. De meeste eigenschappen van de oorspronkelijke cel verdwijnen daarbij volledig. Dertig dagen na het inbrengen van de vier genen kunnen de onderzoekers de geïnduceerde pluripotente stamcellen oogsten. “Met verschillende kleuringen controleren we de pluripotentie van deze cellen. Bovendien controleren we in kweek en door inspuiten in een muis of deze cellen zich kunnen differentiëren tot verschillende celtypes”, vertelt Freund. “Doordat de herprogrammering een spontaan proces is, zijn de stamcellijnen nooit helemaal hetzelfde. Daarom is het van belang om een goede meetmethode te hebben, als je deze cellen gebruikt voor verder onderzoek.”

Finetuning

Als de iPS-cellen gereed zijn, kunnen Mikkers en Freund ze laten differentiëren tot het gewenste celtype. Stamcellen neigen sterk tot differentiatie. Het is daarom een kunst om ze ongedifferentieerd te houden, maar ook om de differentiatie te sturen in de gewenste richting. “Dat is op dit moment de grootste bottleneck. Er is al veel mogelijk, maar nog niet alles”, zegt Mikkers. “Wereldwijd gebeurt hier veel onderzoek naar. Het onderzoek is zo intensief en er zijn zo veel verschillende factoren die een rol spelen, dat we hiervoor samenwerken met de hele embryonale stamcel-community. Samen streven we naar standaardprotocollen die iedereen kan gebruiken. Soms zijn we bijvoorbeeld al wel in staat om een stamcel te laten uitgroeien tot een neuron, maar nog niet tot het speciale subtype dat we voor een bepaald onderzoek nodig hebben. Daar is nog verdere finetuning voor nodig.”

Om een iPS-cel te laten differentiëren tot hartspiercel, laten Freund en zijn collega's de cellen groeien in aanwezigheid van een ander celtype, een endodermale cel. Deze cel produceert dan de groeifactoren die zorgen voor de gewenste differentiatie. “In feite gebruiken we het systeem wat ook gebruikt wordt in een embryo”, zegt Freund. “Wereldwijd is echter de trend om in plaats van endodermale cellen een gedefinieerd systeem te gebruiken, met een speciaal groeimedium waar je groeifactoren aan toevoegt. Door te spelen met de samenstelling en de timing kun je de differentiatie sturen.”

Hartritmestoornis

Naast hun betrokkenheid bij de iPS-faciliteit gebruiken Freund en Mikkers de iPS-cellen ook voor eigen onderzoek. Freund doet bijvoorbeeld onderzoek naar verschillende erfelijke afwijkingen van hart- en bloedvaten. Hij vertelt: “Wij doen onderzoek naar een aandoening waarbij de bloedvaten niet goed functioneren, waardoor patiënten last van bloedingen krijgen. We zijn bezig om hiervoor stamcellen te kweken, die we tot twee verschillende soorten bloedvatcellen willen laten differentiëren. We weten dat bij deze aandoening de interactie tussen beide soorten bloedvatcellen is verstoord. We willen in kweek bekijken of we medicijnen kunnen vinden die deze interactie verbeteren.” Daarnaast kweekt Freund hartspiercellen van patiënten met een erfelijke hartritmestoornis, om het effect van medicijnen te testen. Proefdieren zoals ratten en muizen zijn daarvoor minder geschikt, omdat hun hart te snel klopt. Mikkers gebruikt de stamcellen voor onderzoek naar de erfelijke immuunziekte SCID. SCID staat voor *Severe Combined Immune Deficiency syndrome*. “Bepaalde SCID-patiënten missen twee soorten afweercellen, waardoor ze in hun eerste levensjaar al een beenmergtransplantatie moeten ondergaan. Het mooiste zou zijn om hun eigen beenmerg te kunnen gebruiken, maar dat bevat de SCID-mutatie. Daarom proberen we nu in stamcellen de SCID-mutatie te repareren.”

Stamceltherapie

De mogelijkheden van de geïnduceerde pluripotente stamcellen lijken onbeperkt. Wat te denken van stamceltherapie? Kunnen straks de zieke cellen van een patiënt vervangen worden door gezonde, op basis van eigen geïnduceerde stamcellen? De Japanse professor Yamanaka doet al onderzoek in deze richting, maar volgens Mikkers en Freund is de toepassing hiervan nog heel ver weg. Ze zien nog tal van praktische bezwaren. Mikkers verklaart: “In feite is er nog heel veel ongewis. Allereerst is het op dit moment nog niet mogelijk om gedifferentieerde cellen te scheiden van ongedifferentieerde cellen. Als je per ongeluk een ongedifferentieerde cel in het lichaam van een patiënt brengt, zal dat een tumor kunnen vormen. Bovendien kunnen er door de lange kweek mutaties ontstaan die problemen geven. Tenslotte gebruiken we op dit moment virussen, die op plekken in de DNA van de huidcel integreren. Hierdoor kan de expressie van celegeen genen beïnvloed worden. Hiervoor bestaan al wel alternatieven, maar die zijn nog niet efficiënt. We weten er nog veel te weinig vanaf en kunnen nu net beginnen met fundamenteel onderzoek. Vandaar dat wij zelf op dit moment vast houden aan de virusmethode, omdat ons doel onderzoek is, en geen therapie.”

iPS-muis Xiao Xiao

Chinese onderzoekers hebben de technologie van geïnduceerde pluripotente stamcellen zelfs al gebruikt om een muis te klonen uit de huidcellen van een volwassen muis. Ze fuseerden de iPS-cellen met een tetraploïde embryo. Een tetraploïde embryo ontwikkelt een placenta en andere cellen die nodig zijn voor de embryonale ontwikkeling, maar niet het lichaam van het embryo zelf. Na de fusie met de iPS-cellen ontwikkelde zich wel een embryo. Twintig dagen later werd een zwarte muis geboren, dezelfde kleur als de muis die gebruikt was voor het maken van de iPS-cellen. Het muisje Xiao Xiao heeft negen maanden geleefd. Samen met zijn 27 broertjes en zusjes kreeg hij 200 nakomelingen. Onder de muizen kwamen veel afwijkingen voor, maar hun nakomelingen leken wel gezond. Overigens werd een veel grotere groep broertjes en zusjes van Xiao Xiao doodgeboren.