

Ruurd Torensma, UMC St Radboud Nijmegen

## Het geheugen van stamcellen

**Mesenchymale stamcellen uit beenmerg zijn een veelgebruikte bron voor tissue engineering. Er zijn echter diverse andere bronnen waaruit deze multipotente cellen zijn te isoleren. Behalve uit beenmerg, kunnen ze ook worden gehaald uit vetweefsel en navelstrengbloed. Hoewel deze cellen sterk op elkaar lijken en allemaal bot-, kraakbeen- en vetweefsel kunnen vormen, zijn ze niet identiek aan elkaar. Bij de afdeling Immunologie van het Nijmeegse UMC St Radboud hebben dr. Ruurd Torensma en zijn collega's de verschillen gedetailleerd in kaart gebracht. Ze komen tot de conclusie dat de diverse cellen onthouden uit welk weefsel ze afkomstig zijn.**

Het isoleren van MSCs - die vroeger mesenchymale stamcellen heetten, maar nu multipotente stromale cellen worden genoemd - uit navelstrengbloed is niet belastend voor patiënten. Het bloed komt immers beschikbaar na de geboorte van een baby. De stamcellen kunnen worden ingevroren en worden gebruikt voor de baby als deze op latere leeftijd stamcellen nodig zou hebben. De MSCs kunnen echter ook voor andere patiënten worden ingezet omdat ze nauwelijks immunogeen zijn en daardoor geen afweerreactie

bij de ontvanger teweeg brengen. 'De MSCs uit de navelstreng, die *unrestricted somatic stem cells* (USSC) worden genoemd, zouden niet alleen bot, kraakbeen en vet kunnen vormen, maar ook levercellen, bloedcellen en zenuwcellen. 'Wij hebben cellijnen van deze cellen gemaakt en zijn tot de conclusie gekomen dat dit inderdaad mogelijk is, maar dat het wel een stuk ingewikkelder is dan tot nu toe werd gedacht', zegt biochemicus en immunoloog Torensma.

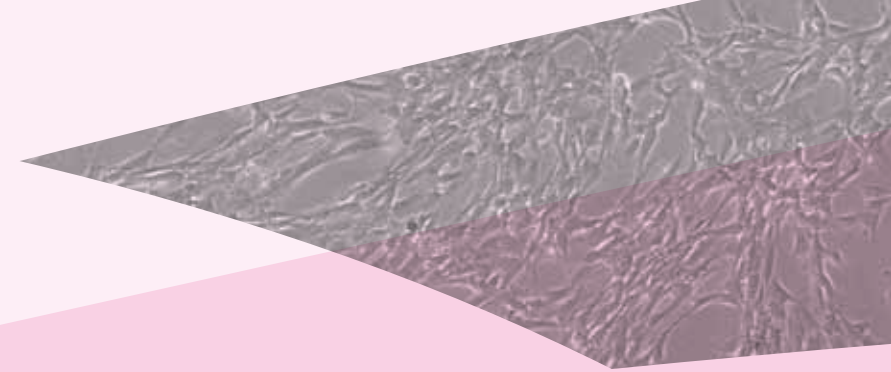
De USSCs uit navelstrengbloed zijn, in samenwerking met het Leidse LUMC, gekarakteriseerd en vergeleken met MSCs die werden geïsoleerd uit vetweefsel en uit beenmerg. Ze zijn gestimuleerd om bot te vormen en de onderzoekers hebben met behulp van de micro-array techniek geanalyseerd in welke mate de genen daarbij zijn aan- en uitgeschakeld en welke schakelaars, micro-RNAs, daarbij een rol spelen. Torensma: 'We hebben diverse clusters van genen gevonden en diverse micro-RNAs opgespoord die een rol spelen bij de botvorming. Ook hebben we een micro-RNA gevonden dat de botvorming juist remt. Mede op basis daarvan hebben we stoffen geïdentificeerd die de differentiatie

van MSCs sturen in de richting van botcellen in plaats van richting vetcellen.'

### **Afweeeronderdrukkend**

Torensma en zijn collega's van het Nijmegen Centre for Molecular Life Sciences (NCMLS) hebben ook de in de literatuur gemelde afweeeronderdrukkende eigenschappen van de diverse stromale cellen onderzocht. De drie celtypen die afkomstig zijn uit de verschillende bronnen zijn alle drie niet erg immunogeen, wat betekent dat ze slechts een geringe afweerreactie bij een gastheer opwekken. De USSCs uit navelstrengbloed onderdrukken de afweer zelfs, net als andere MSCs dat kunnen. Torensma: 'Dat is goed nieuws. Het betekent dus dat we MSCs uit diverse bronnen buiten de patiënt kunnen isoleren en transplanteren. De zogeheten allogene transplantatie van deze cellen naar patiënten is dus goed mogelijk. We kunnen ze dan ook invriezen en op de plank klaar leggen voor als zich een patiënt aandient.'

De onderzoekers hebben ook beschreven hoe de cellen uit het navelstrengbloed in staat zijn om het afweersysteem te onderdrukken. Het blijkt dat de cellen de activiteit van de



Unrestricted Somatic Stem Cell

gebruikelijke afweercellen onderdrukken, maar niet altijd volgens de mechanismen die al in de literatuur bekend zijn. Torensma: 'We hebben een lange lijst van genen gevonden die wellicht een rol spelen. Maar een specifieke factor die voor het afweeronderdrukkende effect verantwoordelijk is, hebben we nog niet gevonden. Waarschijnlijk is het geen eiwit of peptide. Het is een heel klein molecuul. We denken dat het een bepaald suikerhoudend vetmolecuul (ganglioside) is dat door de cel wordt gemaakt.'

Het NCMLS heeft een aantal technieken ontwikkeld ten behoeve van het onderzoek in het kader van het DPTE-programma, zoals een speciale faciliteit die volledig is gericht op het maken van micro-arrays, waarmee de activiteit van grote hoeveelheden genen tegelijkertijd kan worden gemeten. 'Deze loopt als een tierelier', zegt Torensma, die ook de nieuwe *two foton microscopy* faciliteit noemt, waarmee dieper dan normaal

fluorescentie in weefsels kan worden waargenomen. 'De techniek verkeert nog in een experimentele fase, maar we hebben er al mee gekeken naar de bloedvatvorming in zebrafisjes, een veel gebruikt diermodel, en naar de vorming van lymfevaten. Dat levert zeer spectaculaire filmpjes op, waarop je precies ziet hoe de differentiatie en ontwikkeling van de cellen in hun werk gaan.'

#### Kankerstemcellen

Torensma ziet als een van de belangrijkste resultaten van het onderzoek de constatering dat de aard van de multipotente stromale cellen afhangt van het weefsel waaruit ze zijn gewonnen. Dat het uitmaakt of ze uit navelstrengbloed, beenmerg of vetweefsel komen. 'De MSC "onthoudt" uit welke omgeving zij komt. Er is een soort geheugen ontstaan, een zogeheten epigenetische imprinting, die niet wordt *gereset* als de cel de-differentieert. We hadden zes jaar geleden ook niet verwacht dat er zoveel manieren zijn waarop cellen de immuni-

teit van hun gastheer kunnen remmen. We hebben al zes verschillende mechanismen gevonden die de cellen kunnen gebruiken. MSCs uit navelstrengbloed onderdrukken het immuunsysteem anders dan die uit het beenmerg. Dit soort cellen kennen de immunologieboeken blijkbaar op hun duimpje.'

De onderzoeksgroep van Torensma heeft het pad van de tissue engineering wat verlaten sinds de laatste jaren de kankerstemcellen zijn opgekomen. 'We kijken nu naar de combinatie van stamcellen-immuunafweer-kanker. Dat cellen ook kunnen de-differentiëren was ooit vloeken in de kerk. Wij hebben laten zien dat stamcellen weldegelijk in hun ontwikkeling terug kunnen gaan, met behoud van enkele van hun oorspronkelijke kenmerken. We gaan de wederwaardigheden van die stamcellen en kankerstemcellen nu volgen met beeldvormende technieken zoals *two foton* microscopie en MRI.'

Stefan Braam, LUMC Leiden

## Medicijnen testen met hartspiercellen

**Er zijn nogal wat geneesmiddelen die een negatief effect hebben op het hart.**

**Het is bij het ontwikkelen van medicijnen moeilijk om stoffen afdoende te testen op eventuele negatieve effecten op de hartspier. Want primaire menselijke hartcellen zijn niet voorhanden voor de ontwikkeling van medicijnen, er zijn geen goede cellijnen van hartcellen beschikbaar en dieren voldoen niet als model doordat hun hart op teveel punten afwijkt van dat van mensen. Dr. Stefan Braam ontwikkelt bij de afdeling Anatomie en Embryologie van het Leidse LUMC testmodellen op basis van hartspiercellen die zijn afgeleid van stamcellen.**

Het menselijke hart is fascinerend. Ondanks een relatief geringe vernieuwing van 0,5 procent per jaar zorgen de hartspiercellen ervoor dat het hart een leven lang gemiddeld 60 keer per minuut, 24 uur per dag en 365 dagen per jaar klopt. Soms gaat er wat mis en ontstaat hypertrofie, een uiteindelijk dodelijke verdikking van de hartspier, of ontstaan hartritme stoornissen. Stamceltherapie zou uitkomst kunnen bieden om beschadigde harten (ook door zuurstoftekort na een hartinfarct) te herstellen. 'Stamceltherapie bij hartbeschadiging

is een geweldige hype geworden. Maar de resultaten in de kliniek vallen tegen en er zijn nog veel vragen over de veiligheid van de therapie. Met hartcellen die zijn verkregen uit embryonale stamcellen is therapie zelfs nog moeilijker, daarom zijn wij vooralsnog afgestapt van deze benadering', zegt Braam, werkzaam op de afdeling van stamcel-pionier Christine Mummery.

Braam concentreert zich op *safety pharmacology* een jong en zich snel ontwikkelend vakgebied dat zich richt op het voorspellen van mogelijk negatieve bijwerkingen van een nieuw medicijn voordat het aan patiënten wordt gegeven. De veiligheidsfarmacologie kijkt, behalve naar zeldzame ongewenste effecten op specifieke weefsels, ook naar effecten op het hele lichaam. Daarbij staan de meest gevoelige organen en orgaansystemen centraal: de lever, het centraal zenuwstelsel, het ademhalingsstelsel en het cardiovasculaire systeem. Soms zijn medicijnen al vele jaren te koop voordat een zeldzame dodelijke bijwerking ervan aan het licht komt. Een berucht voorbeeld van een cardio-toxisch middel, dat schadelijk is voor

het hart, is een histamine-remmer die op grote schaal (vaak zonder recept) werd verkocht tegen hooikoorts. Braam: 'Ruim een kwart van de medicijnen die de afgelopen 30 jaar in de Verenigde Staten van de markt zijn gehaald vanwege gevaarlijke bijwerkingen, was cardio-toxisch.'

### **Volledig gecontroleerd**

Er bestaan technieken om embryonale stamcellen in een kweekbakje zich te laten ontwikkelen tot hartspiercellen. De groep van Mummery heeft daarin veel ervaring en werkt met een volledig gecontroleerd kweekstelsel, waarin bijvoorbeeld dierlijk serum in het kweekmedium ontbreekt. De cellen worden gekweekt in combinatie met cellen van andere weefseltypen om de differentiatie van de cellen tot hartspiercellen te sturen. Braam heeft een methode ontwikkeld om cellen genetisch zo te veranderen dat ze groen oplichten als ze volledig zijn gedifferentieerd tot hartspiercellen. Zo kunnen de onderzoekers precies zien welk deel van de cellen in het kweekbakje hartspiercellen zijn geworden. Inmiddels zijn Braam en zijn collega's in staat om in twaalf dagen tijd een



celkweek te groeien waarvan 35 procent bestaat uit de gewenste cardiomyocyten. Braam: 'Het isoleren van de embryonale cellen uit een menselijk embryo is een eenmalige activiteit. Daarna hebben we een cellijn die we voortdurend kunnen gebruiken. Na de differentiatie en het inbrengen van het genconstruct, blijken alleen de groene cellen de gedifferentieerde hartspiercellen te zijn en ook alle cellen die "kloppen" zijn groen. Die cellen kunnen we gebruiken voor het ontwikkelen van nieuwe medicijnen, maar ook voor het testen van geneesmiddelen op veiligheid.'

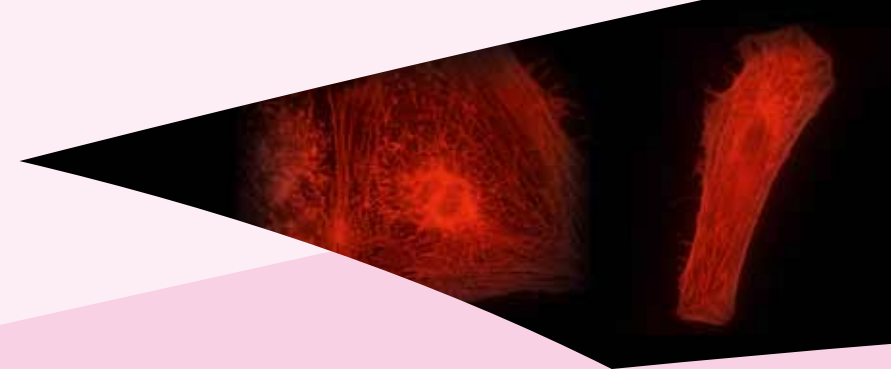
Braam verwacht dat het ook mogelijk is om het effect van medicijnen op de hartspiercellen van individuele patiënten te testen. Het is immers mogelijk om gedifferentieerde delende cellen terug te brengen naar het stadium van een embryonale stamcel (de *induced pluripotent stem cell*). Zo kunnen bijvoorbeeld huidcellen worden teruggebracht naar het stamcelstadium en vervolgens met

de technieken uit het laboratorium van Braam en zijn collega's worden opgekweekt tot hartspiercellen. Braam: 'Dan kunnen we de reactie van de hartspiercellen die afkomstig zijn van een patiënt met een afwijkend ECG bestuderen. Bijvoorbeeld hun respons op bepaalde medicijnen. Stamcellen zullen proeven met dieren waarschijnlijk niet volledig kunnen vervangen, maar ik ben ervan overtuigd dat het stamcelonderzoek het preklinische onderzoek ingrijpend zal veranderen.'

#### **Hartcellen op een chip**

Een belangrijke en gevaarlijke bijwerking van medicijnen kan het opwekken van hartritme stoornissen zijn. Dat effect ontstaat onder meer door de interactie van het medicijn met eiwitten in de cel die verantwoordelijk zijn voor de depolarisatie van de elektrische puls. Deze bepaalt het tempo van de hartslag. Als die depolarisatie vertraagt, kan dat leiden tot hartritme stoornissen. Samen met Pluriomics, een biotech bedrijfje

waarvan Braam mede-oprichter is, wordt gewerkt aan een systeem waarbij de hartspiercellen op een chip groeien. De elektrische puls die samenhangt met het samentrekken van de cellen kan daarbij worden geregistreerd. Zo kan het effect van medicijnen op het samentrekken van de hartspiercellen worden vastgesteld. Braam: 'Normaal trekken de klompjes hartspiercellen ritmisch samen, wij zijn nu in staat een soort ritmestoornis op te wekken.' Het systeem wordt verder verfijnd door de cellen niet op een hard en star oppervlak te laten groeien, maar op een meer flexibele ondergrond. Daardoor raken de cellen minder gestrest en wordt de natuurlijke situatie beter nagebootst.



*Hartspiercel gemaakt van een humane embryonale stamcel*

Wim Fibbe, LUMC Leiden

## Gestandaardiseerd kweken van stamcellen

**Veel therapieën rond beenmerg- en bloedceltransplantatie lijden onder een gebrek aan voldoende cellen. Bij voorkeur moeten deze daarom eerst worden opgekweekt tot er genoeg zijn. Soms ook moeten ze worden gestimuleerd in een bepaalde ontwikkelingsrichting of aangezet tot een specifieke activiteit. Dat vermeerderen is geen sinecure, want de gebruikelijke kweekmedia bevatten dierlijke producten, zoals foetaal kalfs-serum. Dat vormt een apotheek aan dierlijke eiwitten, groei- en differentiatiefactoren. Maar toepassing daarvan is niet alleen ongewenst vanwege potentiële gezondheidsrisico's voor mensen, ook omdat volledig onduidelijk is uit welke componenten het bestaat. Hematoloog en stamcelbioloog prof. dr. Wim Fibbe ontwikkelt technieken om mesenchymale stamcellen op een standaard wijze te kweken, bij voorkeur zonder dit serum en zodat hij de diverse celtypen kan karakteriseren.**

‘We willen af van dat kalfs-serum dat, vanwege de gekke koeien ziekte in Europa, wordt betrokken van koeien op Amerikaanse boerderijen’, zegt Fibbe, hoofd van de afdeling Immunohematologie en Bloedtransfusie van het LUMC Leiden. ‘De techniek kan niet gestandaardiseerd worden. Het liefst zou je daarom alleen de benodigde factoren uit het

kalfs-serum synthetiseren en gebruiken. Maar tot nu toe zijn de beschikbare recombinant groeifactoren in combinatie met eiwitten minder goed dan het foetale kalfs-serum zelf. Daarom hebben wij het serum vervangen door een oplossing van afgebroken menselijke bloedplaatjes (plaatjes-lysaat). Bloedplaatjes blijken de groei van multipotente stromale stamcellen (MSCs, ook wel mesenchymale stamcellen genoemd) te stimuleren. Maar bloedplaatjes bevatten ook allerlei componenten waarvan je geen weet hebt. Bovendien bevorderen ze de groei van de MSCs zoveel sterker dan foetaal kalfs-serum, dat er afwijkingen in het erfelijk materiaal kunnen optreden. Je wilt geen risico lopen dat de in het laboratorium opgekweekte cellen kankercellen worden.’

Het is een dilemma dat Fibbe en de zijnen verder hebben onderzocht. Muizen MSCs die zijn opgekweekt met behulp van foetaal kalfs-serum blijken gemakkelijk te transformeren tot tumorcellen en tumoren in het bot te vormen. In mensen lijkt dat niet het geval te zijn, maar toch is voorzichtigheid geboden. Fibbe: ‘Franse onderzoekers zagen dat ook een plaatjes-lysaat afwijkingen veroorzaakt aan de chro-

mosomen van de MSCs. Zij hebben uitgezocht hoe dat komt en ontdekt dat bepaalde groeifactoren in het lysaat de cellen activeren. Dat zie je terug in de chromosomen van die cellen. Andere onderzoekers hebben gevonden dat MSCs die uit vetweefsel zijn gewonnen met foetaal kalfs-serum binnen vier weken kwaadaardige transformaties ondergaan, en daarmee een risico vormen voor het ontstaan van kanker. Zelf hebben wij die bevindingen niet kunnen reproduceren en achteraf blijken ze te berusten op verontreiniging van de kweek met tumorcellen. Wij concluderen daarom dat het risico op kwaadaardige ontaarding heel gering is.’

### **Afweeeronderdrukkend**

Fibbe's karakterisering van MSCs uit vet, beenmerg en andere bronnen, heeft laten zien dat het daarbij om deels verschillende soorten cellen gaat. Zo zien MSCs uit vetweefsel er van buiten anders uit dan de rest en ze delen ook sneller. Terwijl MSCs die zijn gewonnen uit de placenta minder goed kraakbeen vormen dan MSCs uit het beenmerg. Fibbe's groep heeft ook de legendarische afweeeronderdrukkende eigenschappen van MSCs bestudeerd.



Daarmee zouden ze aan het afweersysteem kunnen ontsnappen. 'Dat is lang niet altijd waar', meent Fibbe. 'Bij muizen zagen we dat de allogene MSCs uit mensen wel degelijk een immuunreactie opwekken. Spuit je ze na een eerste keer nog eens in, dan worden ze onmiddellijk afgebroken, zoals je zou verwachten. Wel onderdrukken ze in de reageerbuis heel wat activiteiten van een normaal immuunsysteem. Maar dat is een kunstmatige situatie. MSCs beïnvloeden wel veel functies van immuuncellen, maar ze zijn niet zelf regulatorisch en ontsnappen zeker niet aan het immuunsysteem. Worden slechts één keer cellen getransplanteerd, dan is dat niet zo erg. Geef je echter een tweede celtransplantatie van dezelfde donor, dan moet je erg oppassen.'

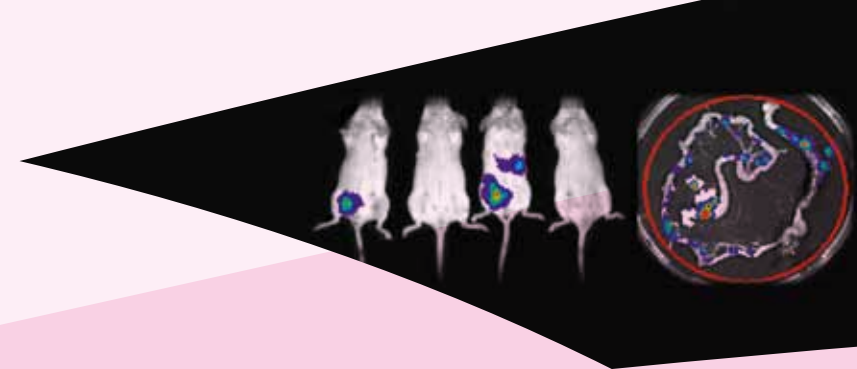
Fibbe onderzocht ook multipotente stromale cellen wanneer deze in een dier worden gespoten. Door specifieke kleuring van de MSCs kon hij letterlijk zien waar de cellen heen gaan, hoe lang ze leven en of een lang leven noodzakelijk is

voor het therapeutische effect van MSCs. Hij concludeert dat de MSCs in diermodellen geen lang leven zijn beschoren. 'Dat is maar goed ook', benadrukt Fibbe. 'Want als de cellen door het opkweken getransformeerd zouden raken, is het maar beter dat ze snel afsterven.' De ingespoten stromale cellen blijken zich vooral op te houden op plekken waar weefselschade is. Wellicht valt deze 'homing' te verbeteren door toepassing van weefsel-specifieke adhesiemoleculen. Fibbe: 'We hebben ook gezien dat bepaalde klonen van MSCs die uit navelstrengbloed worden gekweekt, differentiëren in de richting van bot. Doen ze dat ook in vivo, in een diermodel? Je wilt toch niet dat als je die MSCs in het hart spuit om de hartspier te herstellen, deze opeens een stukje bot gaan maken.'

#### Klinische studies

In vijf verschillende klinische studies, die in samenwerking met een aantal Europese centra werden uitgevoerd, is

de standaardisering van de techniek om de MSCs in het laboratorium op te kweken toegepast. Daardoor hebben de verschillende centra hun studieresultaten onderling kunnen vergelijken. Een deel van de studies richtte zich op het onderdrukken van de afstotingsreactie die kan ontstaan als kankerpatiënten na hun behandeling worden getransplanteerd met bloedvormende cellen van een donor. De afweercellen onder de gedoneerde cellen kunnen het weefsel van de gastheer te lijf gaan in een zogeheten *graft versus host* reactie. Om zo'n reactie te onderdrukken, kunnen MSCs van een tweede donor worden gegeven aan de patiënt. Fibbe: 'We hebben geconstateerd dat zulke patiënten gunstig kunnen reageren op een gestandaardiseerde kweek van diverse typen MSCs.'



Migratie van MSC's in in vivomodel-  
len (door middel van bioluminescentie)

Elaine Dzierzak, Erasmus MC Rotterdam

## Snapshots van de geboorte van stamcellen

Al meer dan een halve eeuw vinden er beenmergtransplantaties plaats bij leukemiepatiënten die eerder een chemokuur ondergingen. De hematopoietische stamcellen (HSCs) uit het beenmerg van een donor moeten de door de kankermedicijnen lamgelegde bloedvorming weer op gang brengen. Sindsdien is er veel bekend geworden over deze stamcellen, die inderdaad de bloedvorming kunnen herstellen. Ook dat ze zich lastig laten opkweken in voldoende grote hoeveelheden en dat het belangrijk is een donor van de HSCs te vinden van wie het weefseltype goed overeenkomt met dat van de patiënt. Twee decennia geleden werd een nieuwe bron van HSCs aangeboord: het navelstrengbloed van pasgeborenen. Cellen daaruit zijn gemakkelijker te verkrijgen dan HSCs uit beenmerg, er kan gemakkelijker een match met een donor worden gevonden en bovendien wekken de HSCs uit navelstrengbloed niet zo'n sterke afweerreactie op als die uit beenmerg. Maar deze bron levert maar weinig cellen. Niet te weinig voor de behandeling van kinderen, wel voor volwassenen. 'Daarmee zijn we na een halve eeuw feitelijk terug bij af', zegt ontwikkelingsbioloog prof. dr. Elaine Dzierzak van het Erasmus MC. 'Namelijk, hoe kunnen we de hematopoietische stamcellen buiten het lichaam vermeerderen?'

Als die vraag wordt gesteld aan een ontwikkelingsbioloog, levert dit een voor de hand liggend antwoord op. 'Daarvoor moeten we terug naar de bron van deze stamcellen: naar het embryo', zegt Dzierzak, directeur van het Erasmus MC Stamcel Instituut. 'Ik denk dat deze vraag het best kan worden opgelost door een ontwikkelingsgerichte aanpak; de ontwikkelingen in de embryonale aorta waar de hematopoietische stamcellen voor het eerst ontstaan. We weten dat daarbij de factor BMP4 is betrokken - het *bone morphogenetic protein 4*. Evenals embryonale stamcellen.' Het lag voor de hand om daarom embryonale stamcellen op te kweken in de aanwezigheid van BMP4 en andere stimulerende factoren die in het embryo voorkomen, zoals Hedgehog. Dat bleek echter niet succesvol. 'We kregen nooit HSCs', herinnert Dzierzak zich de teleurstelling na de eerste experimenten. De onderzoekers veranderden de stamcellen genetisch zo dat ze groen kleuren als hun genetisch patroon zich van een embryonale stamcel begint te ontwikkelen in de richting van een hematopoietische stamcel. Zij gebruikten daarvoor het systeem van de bioluminescentie dat het oplichtende

vuurvliegje kenmerkt. 'Hoewel ze wel groen kleuren, zijn ze geen HSCs en kunnen ze dus geen bloedsysteem vormen.'

### Op z'n kop

Dzierzak besloot opnieuw terug te gaan naar het embryo en het nu grondiger aan te pakken en echt te kijken wat er gebeurt tijdens de vorming van HSCs. Door het toepassen van technieken voor drie dimensionale reconstructie en de confocale microscopie werd de veronderstelde kraamkamer van de HSCs afgespeurd op zoek naar snapshots van de geboorte van een hematopoietische stamcel. 'Dat werd een verrassing', zegt Dzierzak enthousiast. 'Wat we zagen, zette onze hele gedachtegang op z'n kop. Het blijkt dat de HSC niet ontstaat uit een embryonale stamcel, maar uit een endotheelcel van het bloedvat; uit cellen die zich onder de aorta-regio bevinden. De HSC functioneert dus eerst als endotheelcel. Op een goed moment verandert haar lot en treedt er een *trans-differentiatie* op, waardoor de endotheelcel, die in feite al een uitgedifferentieerde cel is, een cel met stamceleigenschappen wordt. Dat was nooit eerder vertoond.' Er is geen intermediaire cel



waargenomen tussen de endotheelcel en de HSC. Op de video-opnamen die met de microscoop zijn gemaakt, is te zien dat de platte endotheelcel op bolt. Veranderingen in de fluorescerende kleuren maken duidelijk dat de cel kenmerken verliest die typerend zijn voor endotheelcellen en kenmerken erbij krijgt die behoren bij hematopoietische cellen. Dat wordt bevestigd door histologisch onderzoek. Het proces voltrekt zich in enkele tientallen uren tijdens de ontwikkeling.

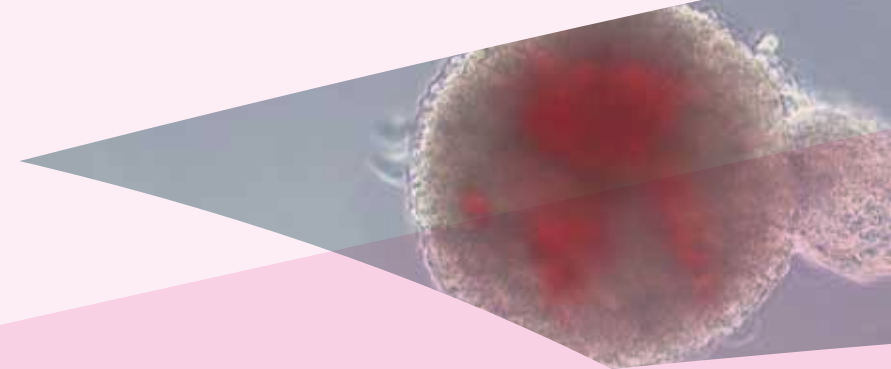
Nu is ontdekt hoe het embryo het doet en wellicht ook is ontdekt hoe zo'n overgang in volwassenen plaats heeft, kan dat richting geven aan hoe hematopoietische stamcellen in het laboratorium vermeerderd zouden kunnen worden. Dzierzak: 'HSCs zijn niet te vermeerderen in vitro, maar endotheelcellen kunnen we wel in het laboratorium kweken. Je kunt ze bij 37 graden Celsius in leven houden in een cultuur met het juiste kweekmedium. We zijn nu aan het uitzoeken hoe we de

factoren die voor de trans-differentiatie verantwoordelijk zijn hun werk moeten laten doen. Zoals BMP4, Hedgehog en andere eiwitten waarvan we weten dat ze bij het ontstaan van HSCs zijn betrokken. Die factoren moeten sequentieel worden toegevoegd. Sommige doen hun werk vroeg in de ontwikkeling van de hematopoietische stamcel, andere juist laat. Van BMP4 weten we dat dit in het embryo pas relatief laat actief wordt.'

#### **Een gemaakte omweg**

'We hebben hier te maken met een opwindende ontwikkeling die ook consequenties kan hebben voor andere cellen', stelt Dzierzak. 'Wellicht zijn er nog meer soorten cellen die kunnen trans-differentiëren of misschien kunnen er uit endotheelcellen ook andere cellen voortkomen. Dat zou betekenen dat we niet die cellen zelf hoeven te kweken en te vermeerderen, maar dat we endotheelcellen kunnen laten groeien en die op een bepaald moment in de gewenste richting kunnen laten trans-differentiëren.

We hebben een omweg moeten nemen om uiteindelijk toch grotere hoeveelheden hematopoietische stamcellen in handen te krijgen voor transplantatie.'



*Hematopoiesis in an embryoid body - from mouse ES cells*

Gerald de Haan, UMC Groningen

## Rijping remmen in het kweekbakje

**De ontwikkelingen in het onderzoek en de toepassing van hematopoietische stamcellen (HSCs) worden belemmerd doordat deze cellen moeilijk buiten het lichaam zijn te vermeerderen. De HSCs, die uit het beenmerg komen, zijn de basis voor alle cellen in het bloed, van rode bloedlichaampjes en bloedplaatjes tot de talloze soorten witte bloedcellen van het immuunsysteem. Terwijl andere soorten stamcellen tegenwoordig goed te kweken zijn, lukt dat met HSCs niet. Dat is opvallend, vindt prof. dr. Gerald de Haan, stamcelbioloog bij het UMC Groningen. Want ooit zijn de beenmergtransplantaties bij de behandeling van bijvoorbeeld leukemie begonnen met de transplantatie van de HSCs.**

Patiënten met leukemie krijgen een heftige chemokuur die de bloedvormende cellen in hun beenmerg vernietigt. Na deze behandeling krijgen ze een oplossing van bloedvormende stamcellen van een donor in hun bloedbaan gespoten. Die cellen zoeken zelfstandig het beenmerg op, nestelen zich daar en herstellen de vorming van bloed- en afweercellen van de patiënt. Hoe meer van zulke donorstamcellen bij de patiënt worden ingespoten, hoe sneller deze herstelt. 'Het is

altijd een beetje "god zegent de greep" geweest', meent De Haan, hoogleraar bij de afdeling Celbiologie. 'Want in de praktijk komen uiteindelijk slechts vijf tot tien procent van die cellen in het beenmerg terecht en het beenmerg herstelt zich nooit meer dan twintig procent. Niemand weet waarom dat zo is.'

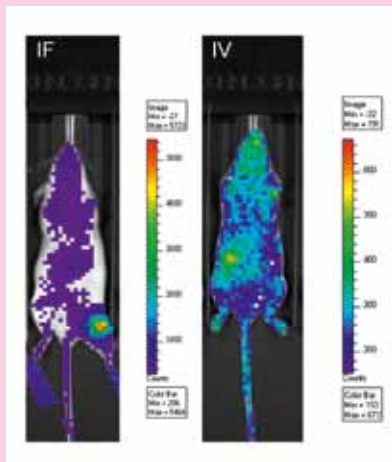
Hoewel volwassen hematopoietische stamcellen voornamelijk de enige stamcellen zijn die vaak klinisch worden toegepast, zijn er recent veelbelovende ontwikkelingen gerapporteerd met mesenchymale stamcellen. Deze MSCs zijn, in tegenstelling tot HSCs, relatief eenvoudig te kweken buiten het lichaam. De Haan: 'Het blijkt heel moeilijk om te beginnen met weinig HSCs en die in het laboratorium te vermeerderen tot een grote hoeveelheid. Ze blijven namelijk geen stamcellen, maar rijpen tijdens het kweken uit tot meer gespecialiseerde bloedcellen. Dat wil je niet, maar het blijkt een bijna niet te onderdrukken eigenschap te zijn van dit soort bloedvormende cellen. MSCs doen dat niet, die blijven ook in kweek stamcellen. Misschien is die uitrijping een manier van de

HSCs om te voorkomen dat ze ontsporen tot kankercellen.'

### **Bloeddonatie**

Artsen zouden graag willen dat ze de HSCs in het laboratorium kunnen opkweken tot grote hoeveelheden. Allereerst natuurlijk om patiënten te kunnen injecteren met een grotere hoeveelheid van deze cellen, zodat hun bloedvormende capaciteit sneller en vollediger herstelt. Bovendien is er de toegenomen mogelijkheid om dit soort stamcellen niet uit het beenmerg van een donor te halen, maar uit de navelstreng van pasgeboren baby's. De Haan: 'Dat zijn weliswaar jonge cellen die het relatief goed doen, maar het zijn er niet heel veel. Je wilt bij een volwassen patiënt toch minimaal honderdduizenden stamcellen transplanteren en dat lukt zo niet. Daarom is deze manier van transplanteren vooral geschikt voor kinderen, hoewel men nu door het samenvoegen van stamcellen uit verschillende navelstrengen toch ook volwassenen kan behandelen.'

Het opkweken van bloedvormende stamcellen kan in de verre toekomst ook een alternatief zijn voor de huidige vorm van



Detection of intrafemorally transplanted bone marrow cells by bioluminescent imaging.

bloeddonatie. De HSCs zijn een ideale bron voor de productie van rode bloedcellen via cellijnen en weefselkweek. 'Het is misschien wat utopisch en voor de langere termijn', erkent De Haan. 'Maar voor de grootste groep mensen met bloedgroep o en Rhesus negatief, zouden we dan slechts één cellijn nodig hebben. Als we begrijpen hoe we de HSCs in kweek kunnen houden, zouden we de uitrijping tot rode bloedcellen buiten het lichaam kunnen laten plaats vinden.'

De afgelopen decennia zijn talloze experimenten gedaan met klassieke en minder klassieke groeifactoren om de HSCs zich te laten vermeerderen. Zonder veel resultaat. 'Wij hebben voor een andere benadering gekozen', zegt De Haan. 'Er zijn stoffes bekend die zich aan de chromosomen hechten en invloed hebben op de staat waarin het chromatine verkeert. Ze kunnen de genexpressie beïnvloeden en de rijping van de cellen tegenhouden.' Het betrokken mechanis-

me is voor een belangrijk deel nog onbegrepen, maar het lijkt erop dat deze stoffen voorkomen dat het chromatine (de ingewikkeld gevouwen en van eiwitten voorziene streng DNA waarop de genen in een chromosoom liggen) zich op het juiste moment ontvouwt. Daardoor worden de betreffende genen moeilijker bereikbaar voor de machinerie die de cel gebruikt voor de productie van eiwitten. De Haan: 'Met dit soort stoffen blijven de cellen steken in een primitiever stadium. Dat hebben we aangetoond met cellen van muizen en dat doen we nu met cellen uit de menselijke navelstreng. Farmaceutische bedrijven testen nu grote hoeveelheden stoffen op dit soort rijpingvertragende eigenschappen.'

#### Black box

Overigens lijkt het erop dat de betreffende stoffen geen zelfstandige activiteit hebben, maar alleen in combinatie met bepaalde groeifactoren. 'We krijgen langzaam maar zeker meer greep op wat er in de cellen gebeurt en welke genen

betrokken zijn bij het uitschakelen van de rijping', zegt De Haan, die behoort tot de groep van meer fundamenteel onderzoekers die graag precies begrijpen wat er gebeurt bij stamceltransplantaties. 'Dat is het nadeel van MSCs. Daarin zitten honderden verschillende cellen, waarvan we geen flauw idee hebben wat ze doen. Voor ons is dat een *black box* waar we niet goed tegen kunnen, klinici hebben daar minder moeite mee. Als het maar werkt, zeggen zij vaak.' De Haan is optimistisch dat het ooit mogelijk zal zijn om hematopoietische stamcellen buiten het lichaam te kunnen groeien. 'Niemand had vijf jaar geleden kunnen voospellen hoe groot de vooruitgang zou zijn op dit gebied. Bijvoorbeeld de IPS, de *induced pluripotent stem cell*, die is gemaakt door het kunstmatig laten terug-differentiëren van weefselcellen, bestond toen nog niet.'

Anton Martens, UMC Utrecht

## Cellen volgen in het levende proefdier

**Bioluminescentie is een belangrijke techniek bij het onderzoek van stamcellen.**

**Sinds onderzoekers erin slaagden om de genen voor deze oplichtende eiwitten uit vuurvliegjes en kwallen te isoleren en in te bouwen in willekeurige andere cellen, is bioluminescentie op grote schaal toegepast om de wederwaardigheden van cellen in petrischaaltjes en in dieren te volgen. Dr. Anton Martens van het UMC Utrecht gebruikt de lichtgevende eiwitten om de rol van stamcellen bij de vorming van bot in kaart te brengen. 'We zijn de afgelopen jaren wel wat bescheidener geworden', bekennt hij.**

'Toen we met ons onderzoek naar stamcellen in het beenmerg begonnen, geloofde men heilig dat daaruit multipotente adulte cellen te isoleren waren. Cellen die alle weefsels zouden kunnen vormen', zegt experimenteel hematoloog Martens van de afdeling Immunologie van het UMC Utrecht. Wij raakten geboeid door deze stromale stamcellen (MSC) uit het beenmerg. Ze laten zich tot enorm grote aantallen opkweken en ze kunnen zich, uitgezaaid op kunststofdragermateriaal, ontwikkelen tot kraakbeen, bot of peesweefsel. Bovendien ondersteunen ze de

vorming van bloedcellen. Wij vroegen ons af of alle MSCs echt multipotent zijn of dat deze stromale cellen meer een mengsel zijn van stamcellen en cellen die zich al in een bepaalde richting hebben ontwikkeld. Zoals wij veronderstelden.'

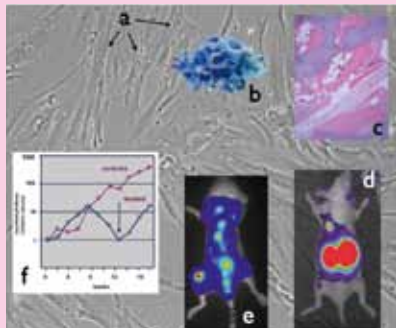
De Utrechtse onderzoekers bleken gelijk te hebben. Ze merkten dat gekweekte MSCs bestaan uit verschillende soorten cellen met soms unieke maar soms ook overlappende eigenschappen. Martens: 'Er blijken grote verschillen in delingssnelheid te zijn, waardoor de snelle groeiers de langzame groeiers overwoekeren. Daardoor leek het indertijd alsof er maar één type, de multipotent stromale stamcel, in het beenmerg zit. Met een panel van 40 antilichamen proberen we nu de verschillende stamcellen te onderscheiden op basis van typerende eiwitten op hun celoppervlak.'

De onderzoeksgroep van Martens zet de bioluminescentie in voor het zichtbaar maken van stamcellen. Ze markeren de stamcellen met het luciferase-gen dat van vuurvliegjes afkomstig is, of koppelen het luciferase-gen aan genen die geactiveerd worden als de

cellen uitgroeien tot botcellen. Zo kan Martens de cellen in levende proefdieren volgen zonder dat hij ze hoeft dood te maken. 'Zo draagt deze techniek bij aan het terugdringen van het aantal proefdieren', benadrukt hij.

### **Humane bloedcellen**

Met gevoelige camera's kan Martens in *real time* en op een niet-invasieve wijze in het intacte proefdier zien of ingebrachte cellen de plaats van bestemming bereiken. Ook kan hij zo meten of de cellen zich vermenigvuldigen en zich tot het juiste weefseltype ontwikkelen. Martens: 'Nog maar enkele jaren geleden dachten we dat stamcellen, zoals de MSCs, direct betrokken zijn bij het herstel van weefsel of bij de vorming van nieuw weefsel. Voor bloedstamcellen geldt dat zeker wel. Maar bij stromale stamcellen is inmiddels duidelijk dat de situatie daar veel complexer is. Deze stamcellen lijken wel betrokken bij het herstel van weefsel, maar vormen slechts voor een deel zelf dat nieuwe weefsel.' Door het meten van de bioluminescentie kunnen de onderzoekers zien hoe de stamcellen uitgroeien of zich verder ontwikkelen tot bot nadat ze zijn uitgezaaid op dragermateriaal



Stamcellen (a) die gekweekt zijn uit beenmerg, worden uitgezaaid op een scaffold (b) en vormen na 6 weken bot (c, roze structuren); indien gemarkeerd met het luciferase-gen is de uitgroei van stamcellen zichtbaar te maken met bioluminescentie (BLI) (d); BLI wordt ook gebruikt om de myeloma tumorstamcellen die in de wervels en het femur van een muis uitgroeien tot tumoren te kunnen lokaliseren (f) alsmede het effect van een behandeling (treated) te meten.

(scaffolds) en bij muizen onder de huid zijn ingeplant. Deze muizen, met een verzwakt afweersysteem, worden vaak gebruikt voor experimenten met dierlijke of menselijke cellen. Bijvoorbeeld voor onderzoek naar de vorming van menselijke weefsels in vivo. 'MSCs van geiten bijvoorbeeld, ontwikkelen zich vrij gemakkelijk in de richting van bot, bij menselijke MSCs gaat dat veel lastiger. Zet je die op een dragermateriaal, waarop je de cellen verder doorkweekt en zet je ze vervolgens in een muis, dan vermeerderen de cellen zich dikwijls niet verder. Soms echter, gaan ze wel bot vormen. Cellen van de ene donor doen het wel, die van een andere niet. Dat blijkt af te hangen van de samenstelling van de gekweekte stamcellen. Voor die botvorming moet het juiste subtype stromale stamcel aanwezig zijn in de kweek.'

Martens heeft ook kunnen zien dat op het stukje menselijk bot spontaan bloedvaatjes uitgroeien. 'Het is opmerkelijk dat wanneer humane bloedstamcellen in de

muizen worden ingespoten, deze hun weg als vanzelf naar het menselijke bot weten te vinden en daar humane bloedcellen gaan produceren. We bestuderen nog welke factoren in het bot daarvoor verantwoordelijk zijn.'

#### Lysaat van bloedplaatjes

De onderzoekers hebben verder gesleuteld aan de vloeistof die wordt gebruikt voor het kweken van de menselijke cellen. Daarbij wordt bloedserum van ongeboren kalveren op grote schaal toegepast. Martens: 'Van dat dierlijke serum willen we eigenlijk af voor menselijke cellen. Daarom hebben we het vervangen door een extract, een lysaat, van menselijke bloedplaatjes en humaan bloedplasma. Kweken we de MSCs met dit afbraakproduct van bloedplaatjes dan krijgen we altijd botvorming. Deze kweekmethode voor humane MSCs is intussen verder ontwikkeld tot een procedure die onder GMP (*Good Manufacturing Practice*) in de kliniek kan worden toegepast.'

Bij leukemie- of myelomapatiënten die een therapie kregen met bloedstamcellen ontstaan soms complicaties doordat de gedoneerde stamcellen ook cellen van het immuunsysteem bevatten. Deze kunnen een afweerreactie tegen het weefsel van de gastheer ontwikkelen (een zogeheten *graft-versus-host* reactie). Die afweerreactie is deels ook de bedoeling omdat de afweercellen daarbij ook de kankercellen van de patiënt aanvalen. Wordt de afweerreactie te heftig dan dreigt het middel erger te worden dan de kwaal. 'Het toedienen van MSCs uit het beenmerg van een willekeurige donor blijkt de graft-versus-host reactie te onderdrukken en dat wordt momenteel klinisch toepast. Of hierbij het anti-leukemie effect ook verloren gaat, is nog niet duidelijk', zegt Martens. 'Wij hebben in proefdieren kunnen aantonen dat dit effect blijft bestaan. Dat is hoopvol voor patiënten.'