

# **Geïnduceerde pluripotente stamcellen**

Nu al een volwaardig alternatief voor embryonale stamcellen?

Charlotte Roelofs  
Begeleider Prof. Dr. Ir. Ben J. G. Scheres

3284700  
Universiteit Utrecht

# Inhoud

Hoofdstuk 1 Introductie.....	3
Hoofdstuk 2 Productie.....	6
2.1 Somatische celkerntransfer.....	6
2.2 Cellulaire fusie.....	6
2.3 Direct herprogrammeren door middel van transcriptiefactoren.....	7
2.3.1 Yamanakafactoren.....	7
2.3.2 Variaties & Aanpassingen.....	8
Hoofdstuk 3 Moleculaire eigenschappen van ES- en iPS-cellen.....	10
3.1 De gouden standaard.....	10
3.2 Moleculaire eigenschappen.....	10
3.2.1 Genexpressie.....	10
3.2.2 Chromatinestructuur.....	11
3.2.3 Epigenetisch geheugen.....	12
Hoofdstuk 4 Problemen met de productie van iPS-cellen.....	13
4.1 Kanker.....	13
4.2 Efficiëntie.....	15
Hoofdstuk 5 Conclusie.....	16
Referentielijst.....	17

# Hoofdstuk 1 Introductie

Vanaf het moment dat een eicel bevrucht wordt door een spermacel is het nu ontstane embryo bezig met delen en differentiëren. Uit het kleine klompje cellen ontstaan de 220 verschillende celtypes die zich in het menselijke lichaam bevinden. Er liggen uitermate potente cellen aan de basis van wat ooit een volwassen mens wordt. Deze zogeheten stamcellen zijn van een enorm belang bij de ontwikkeling van elk organisme. Stamcellen zijn bijzonder door twee specifieke eigenschappen die andere cellen niet bezitten. Ten eerste bezitten ze de eigenschap van zelfvernieuwing: één stamcel kan prolifereren naar twee dochtercellen die dezelfde ongedifferentieerde pluripotente staat bezitten. Ten tweede kan een stamcel differentiëren tot alle gespecialiseerde celtypes van het menselijke lichaam (Brivanlou *et al.*, 2003). Er zijn verschillen in de potentie van stamcellen. De krachtigste stamcel, de onipotente stamcel, kan differentiëren tot elke cel van de embryo plus de cellen van het extra-embryonale weefsel. Pluripotente stamcellen verschaffen al de celtypes waar een embryo uit bestaat, waar multipotente cellen alleen de cellen binnen dezelfde cellijn kunnen genereren. Unipotente stamcellen kunnen alleen zichzelf produceren en repareren zodanig het weefsel waarin zij worden gevonden. Dit type stamcel verschilt alleen van een gewone cel door de zelfvernieuwing (Hochedlinger & Plath, 2009). Niet alleen in embryo's maar ook in een later stadium van de ontwikkeling komen stamcellen voor. In zoogdieren zijn alleen de zygote en vroege blastomeren onipotente. Een voorbeeld van een multipotente stamcel is de hematopoëtische stamcel, die alle bloedceltypes genereert (Jaenisch & Young, 2008). Therapieën gebaseerd op bestaande stamcellen worden al langer toegepast, bijvoorbeeld beenmergtransplantatie.

Door de flexibiliteit in ontwikkeling die stamcellen vertonen wordt er veel onderzoek gedaan naar het gebruik van stamcellen voor het genezen van verscheidene ziektes. Een stamcel die tot elke cel van de drie kiembladen kan differentiëren is veelbelovend. Met behulp van stamcellen zouden behandelingen kunnen worden ontwikkeld voor fysiek trauma, degeneratieve en genetische ziektes, al dan niet in combinatie met genterapie. Tevens zou stamceltherapie extensieve weefselschade kunnen minimaliseren, wat onder andere patiënten met brandwonden ten goede komt. Met een 'skin gun' kunnen eigen huidstamcellen van een brandwond-patiënt op diens wonden worden gespreid<sup>1</sup>. De basis voor deze behandeling werd in 2007 door Hartmann en collega's, waaronder Gerlach, gepresenteerd (Hartmann *et al.*, 2007). Behalve voor onderzoek naar stamcelgebaseerde behandelingen worden de cellen ook gebruikt om de menselijke embryologie, maturatie, cel-cel interactie, differentiatie en de ontwikkeling van ziektes te bestuderen (Borge & Evers, 2003).

Voor het onderzoek naar stamcellen werd tot voor kort veelvuldig gebruik gemaakt van embryonale stamcellen, die voornamelijk worden verkregen via in-vitrofertilisatie. In-vitrofertilisatie is een manier voor koppels om kinderen te krijgen wanneer een natuurlijke zwangerschap niet mogelijk is. Bij deze techniek wordt een eicel buiten het lichaam van de vrouw bevrucht met een zaadcel. Volgens de Nederlandse wetgeving mogen hoogstens twee embryo's tegelijkertijd teruggeplaatst worden. Als er bij een behandeling meer dan twee embryo's verkregen worden én het koppel deze niet wil invriezen, wordt gevraagd of het koppel de embryo's aan de wetenschap wil schenken (Gearhart & Coutifaris, 2010). Tevens kan na een abortus het ongewenste embryo, met toestemming van beide ouders, gebruikt worden voor stamcelonderzoek (Borge & Evers, 2003). De stamcellen worden vijf dagen na de bevruchting uit de *inner cell mass* van de embryo gehaald (Brivanlou *et al.*, 2003). Na extractie worden de cellen gedissocieerd in een calcium- en magnesiumvrij medium, waarna ze op muizen embryonale fibroblasten of humane *feeder cells* geplaat worden. De muizencellen worden bestraald zodat ze niet gaan prolifereren. De stamcellen kunnen lang in een ongedifferentieerde staat bewaard worden tot ze nodig zijn voor onderzoek (Brivanlou *et al.*, 2003).

---

1 [http://www.dumpert.nl/mediabase/1543721/71664590/the\\_skin\\_gun.html](http://www.dumpert.nl/mediabase/1543721/71664590/the_skin_gun.html)

Het feit dat het embryo vernietigd wordt door het weghalen van de stamcellen is mede oorzaak van de controverse die om het stamcelonderzoek hangt (Chung *et al.*, 2008; Denker, 2006). De site eurostemcell.org, een door de EU gesponsorde site over stamcellen, stelt dat het morele dilemma bij stamcelonderzoek gaat over het feit dat we tussen twee morele principes moeten kiezen. Aan de ene kant is er plicht om lijden te verlichten, en aan de andere kant staat de plicht om menselijk leven te beschermen. De tweede plicht is alleen van toepassing wanneer de embryo als volwaardig mens wordt beschouwd. Heeft een embryo van vijf dagen oud rechten? Wanneer kan je spreken van leven dat beschermd moet worden? Het religieuze standpunt stelt dat men spreekt over leven vanaf het moment van bevruchting. Dit maakt stamcelonderzoek in landen zoals Amerika, waar religie een bepalende factor is van de publieke opinie, onderwerp van hevig debat (Borge & Evers, 2003). Ex-president Bush heeft tot twee maal toe de Stem Cell Research Enhancement Act tegengehouden, terwijl een meerderheid in Congress werd behaald. Op 9 maart 2009 heeft huidig president Barack Obama de restricties opgeheven, en wordt er belastinggeld aan het onderzoek gespendeerd.

Chung *et al.* hebben in 2008 een techniek ontwikkeld waarbij het embryo niet vernietigd wordt door de stamceleextractie. Bij de embryo's werd een blastomeer verwijderd, deze werd bewaard in een medium met de eigenschappen van de *inner cell mass niche*. De embryo's werden ingevroren nadat ze de blastocyst-fase hadden bereikt (Chung *et al.*, 2008). Behalve om het gebruik van bestaande embryo's bestaat er tevens een ethische discussie over het creëren van embryo's voor onderzoek (Borge & Evers, 2003). De morele basis is de theorie van Tom Regan (1983) die stelt dat dieren, dus ook menselijke embryo's, een inherente waarde hebben en daardoor niet als middel voor een doel mogen dienen. Elk levend wezen is 'subject-of-a-life' en mag niet 'gecreëerd' worden voor een doel, zoals onderzoek naar stamcellen. In veel landen is het bij wet verboden om embryo's te creëren voor onderzoek.

Het klonen van dieren (Thomson *et al.*, 1998) heeft aangetoond dat de mate van differentiatie van geprofileerde cellen kan worden teruggebracht naar die van embryonale cellen. In 2006 werd door Yamanaka en Takahashi bewezen dat de expressie van vier factoren pluripotentie induceert bij somatische cellen. Deze cellen werden geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPS-cellen) genoemd, en kunnen net zoals ES-cellen gebruikt worden bij het behandelen van verschillende ziektes. Aangezien ze van gedifferentieerde cellen worden gegenereerd, en er geen embryo's voor moeten worden ontwikkeld, is er geen sprake van de ethische beladenheid die met embryonale stamcellen gepaard gaat. Verder is het ontwikkelen van iPS-cellen relatief simpel en door de meeste laboratoria uit te voeren, in tegenstelling tot de complexe methodes die gebruikt worden voor het verkrijgen van embryonale stamcellen (Hanley *et al.*, 2010).

De iPS-cellen hebben net zoals 'gewone' stamcellen het eeuwige leven, wat ze onschatbaar maakt voor onderzoek. In vitro onderzoek is de basis van biomedische ontwikkelingen, maar is grotendeels beperkt tot tumorcellijnen (Park *et al.*, 2008). iPS-cellen kunnen hier uitkomst bieden. Door somatische cellen van een patiënt met ziekte X pluripotent te maken, kan de cellulaire progressie van eerder genoemde ziekte bestudeerd worden (Park *et al.*, 2008). Dit levert een ongekende bron aan informatie op, waardoor ook de ontwikkeling van medicijnen vergemakkelijkt wordt. Vooral voor ziektes, zoals hart- en hersenaandoeningen, waarvoor nog geen dier- of in vitro model bestaat is dit van groot belang (Hanley *et al.*, 2010).

Behalve voor onderzoek naar ziektes en medicijnen kunnen de iPS-cellen zelf als therapie dienen. Genetische defecten kunnen door middel van genterapie verholpen worden. Aangezien de iPS-cellen van de patiënt afkomstig zijn wordt het immunologische probleem van de alternatieve behandelingen omzeild (Hanley *et al.*, 2010). Bij beenmergtransplantaties is naar een sterke overeenkomst tussen de MHC's van patiënt en donor cruciaal, wil de transplantatie lukken. Door middel van deze nieuwe techniek kunnen cellen van de patiënt geogst worden die daarna via genetische manipulatie worden gecorrigeerd. Na de behandeling worden ze terug in het lichaam van de patiënt geplaatst zodat de ziekte verlicht of genezen kan worden. Er is met behulp van iPS-cellen

al onderzoek gedaan naar onder andere sikkelcelanemie, Parkinson, Huntington en het Downsyndroom (Park *et al.*, 2008 & Hanley *et al.*, 2010).

Kortom, het gebruik van iPS-cellen in plaats van embryonale stamcellen heeft meerdere voordelen. Er zijn minder ethische bezwaren aan het gebruik gekoppeld, de in vitro studie van de iPS-cellen verschaft nieuwe kennis over ziektes en hun ontwikkeling, en bij therapeutisch gebruik is er geen kans op een immuunreactie bij de patiënt.

De vraag die in deze scriptie gesteld wordt gaat over de huidige bruikbaarheid van de iPS-cellen. Zijn de geïnduceerde pluripotente stamcellen al klaar om de hoge verwachtingen waar te maken? Het onderzoek naar deze stamcellen is nog relatief jong, pas in 2006 zijn de eerste stamcellen op deze manier geproduceerd (Yamanaka & Takahashi, 2006). Positieve ontwikkelingen hebben plaats gevonden, vooruitgang is geboekt. De publieke opinie is bijgedraaid zoals vaak het geval is bij wetenschappelijke ontwikkelingen die een effect hebben op de maatschappij (Gearhart & Coutifaris, 2011).

Vijf jaar na de eerste geïnduceerde pluripotente stamcellen zijn er meerdere variaties op de zogeheten Yamanaka-factoren ontwikkeld. In deze scriptie worden die kort behandeld, er wordt voornamelijk ingegaan op het originele 'recept'. In een later hoofdstuk worden de geïnduceerde pluripotente stamcellen vergeleken met de embryonale stamcellen. Wat zijn de fundamentele verschillen tussen de twee, en zijn deze verschillen relevant bij het therapeutisch gebruik van iPS-cellen? Hierna wordt kort gekeken naar het onderzoek wat nog moet worden uitgevoerd, waarop de conclusie van deze literatuurstudie volgt.

Uiteindelijk leiden de hoofdstukken tot een antwoord op de centrale vraag: zijn geïnduceerde pluripotente stamcellen klaar om als alternatief voor embryonale stamcellen te dienen.

## Hoofdstuk 2 Productie van geïnduceerde pluripotente stamcellen

Een geïnduceerde pluripotente stamcel moet nagenoeg dezelfde genexpressie hebben als zijn 'natuurlijke' tegenhanger, zodat de basiseigenschappen verkregen worden die stamcellen definiëren. Er is veel onderzoek gedaan naar de genen die verantwoordelijk zijn voor pluripotentie, en hoe deze geactiveerd kunnen worden. Door middel van somatische celkerntransfer, cellulaire fusie of direct herprogrammeren door middel van transcriptiefactoren kunnen de nodige epigenetische veranderingen worden bereikt. In dit hoofdstuk zullen deze drie productiemethodes allen aan bod komen, in een later hoofdstuk wordt specifiek ingegaan op de complicaties die de technieken met zich meebrengen.

Eerst worden de twee conventionele methoden toegelicht, somatische celkerntransfer en cellulaire fusie. Aangezien het direct herprogrammeren de meest belovende techniek is, waar tevens het meest onderzoek naar is gedaan, spitst dit hoofdstuk zich daarop toe. Na het bespreken van het baanbrekende artikel van Yamanaka en Takahashi (2006) wordt recenter onderzoek naar de iPS methode gepresenteerd.

### 2.1 Somatische celkerntransfer

In 1952 pasten Briggs en King somatische celkerntransfer voor het eerst toe in kikkers. De techniek werd gebruikt om te testen of kernen van gedifferentieerde cellen gelijk zijn aan de kernen van zygoten (Briggs & King, 1952). Bij somatische celkerntransfer, oftewel klonen, wordt de celkern van een somatische cel in een ontkernde oöcyt gebracht. Hierdoor wordt een genetische kopie van de somatische cel gemaakt (Jaenisch & Young, 2008). Op deze manier werd in 1997 het schaap Dolly gecreëerd (Wilmut *et al.*, 1997). Omdat de genetische kenmerken voor totipotentie ten tijde van het onderzoek nog niet bepaald konden worden toonde dit experiment niet aan dat somatische cellen herprogrammeerd kunnen worden (Jaenisch & Young, 2008; Hochedlinger & Jaenisch, 2006). Desalniettemin bewees dit onderzoek dat factoren aanwezig zijn in oöcyten die het herprogrammeren faciliteren, er werd gededuceerd dat deze factoren gebruikt konden worden om pluripotentie bij somatische cellen te induceren (Hochedlinger & Plath, 2009). Twee belangrijke conclusies werden getrokken uit dit en soortgelijk onderzoek. Ten eerste bleek dat differentiatie niet irreversibel is, zoals eerder werd gedacht. Ten tweede bewees dit werk dat het genoom van volledig gedifferentieerde cellen constant genetisch totipotent blijft en op elk moment de ontwikkeling van een heel organisme kan ondersteunen (Stadtfeld & Hochedlinger, 2010). Deze ontdekkingen waren van groot belang, aangezien ze het nut en de potentie van stamcelonderzoek onderschrijven.

Helaas is het klonen van gedifferentieerde cellen een zeer inefficiënt proces waarbij de meeste embryo's voor de geboorte sterven. De klonen die zich wel volledig ontwikkelen sterven vaak aan respiratoire of circulatoire problemen en vertonen een toegenomen placenta- en geboortegewicht, het zogenoemde *large offspring syndrome*. De abnormale regulatie van geïmprinte genen ligt waarschijnlijk aan de basis van de abnormaliteiten die worden gezien bij deze nakomelingen (Humpherys *et al.*, 2001). Deze abnormaliteiten impliceren dat somatische celkerntransfer leidt tot imperfect epigenetisch herprogrammeren, waardoor naar betere technieken werd gezocht (Stadtfeld & Hochedlinger, 2010).

### 2.2 Cellulaire fusie

Een belangrijke mijlpaal in het onderzoek naar pluripotentie werd bereikt toen in 1964 Kleinsmith en Pierce aantoonde dat embryonale carcinoomcellen (EC-cellen) in feite multipotentiële stamcellen zijn. Deze cellen zijn afkomstig van een embryonaal teratoma, een neoplasma bestaande uit ongedifferentieerde maligne cellen van alle drie de kiembladen (Kleinsmith & Pierce, 1964). In 1976 werd aangetoond dat de fusie van zo een EC-cel met een thymuscel resulteert in een pluripotente hybride cel (Miller & Ruddle, 1976). De pluripotente staat bleek dominant over de

gedifferentieerde staat van de thymuscel. Dit verraadde de aanwezigheid van pluripotentie-inducerende factoren in de EC-cellen (Stadtfeld & Hochedlinger, 2010). Behalve met EC-cellen zijn er hybrides gemaakt met embryonale kiem- en stamcellen, waarbij de pluripotente staat iedermaal dominant was (Zwaka & Thomson, 2005 in Jaenisch & Young, 2008).

Doordat de hergeprogrammeerde cellen tetraploïd zijn, zijn ze minder geschikt voor patiënt-gebaseerde therapie. Enkele chromosomen van de embryonale stamcel kunnen worden geëlimineerd, toch kan het moeizaam zijn om door middel van deze techniek pluripotente cellen te genereren. Door het weghalen van chromosomen is er tevens kans op grootschalige genomische instabiliteit (Jaenisch & Young, 2008).

### 2.3 Direct herprogrammeren door middel van transcriptiefactoren

Transcriptiefactoren spelen een grote rol bij het bepalen van de celidentiteit in de vroege stadia van differentiatie. Ze beïnvloeden het genexpressieprofiel door middel van repressie of activering van gentranscriptie. De genen waar de factoren effect op hebben kunnen dichtbij en verder gelegen zijn (Alberts *et al.*, 2008; Xie *et al.*, 2004; Davis *et al.*, 1987).

In embryonale stamcellen zijn transcriptiefactoren essentieel voor het behoud van de pluripotente staat en het onderdrukken van differentiatie. Tegelijkertijd blijft diezelfde cel gereed om onder invloed van externe signalen te differentiëren naar een somatische cel. Deze externe factoren zijn voornamelijk op transcriptiefactoren gericht. Door een veranderde genexpressie wordt differentiatie veroorzaakt (Boyer *et al.*, 2005; Boyer *et al.*, 2006).

Kortom, transcriptiefactoren zijn van groot belang bij het bepalen van de celidentiteit. Logischerwijs werden deze eiwitten betrokken bij het proces van herprogrammeren. Door in een somatische cel de transcriptiefactoren die betrokken zijn bij pluripotentie tot overexpressie te brengen kunnen pluripotente cellen geproduceerd worden. Het uiteindelijke doel van elke combinatie van zulke factoren is de reactivering van de endogene pluripotentie genen Oct4, Sox2 en Nanog en de activering van de zelfregulerende lus die de pluripotente staat bewaart (Hanna *et al.*, 2010; Hanley *et al.*, 2010).

#### 2.3.1 De Yamanaka-factoren

In 2006 hebben Kazutoshi Takahashi en Shinya Yamanaka 24 genen gescreend waarvan gedacht werd dat ze verantwoordelijk waren voor het behoud van pluripotentie en zelfvernieuwing in embryonale stamcellen (Hanley *et al.*, 2010). Bij de onderzochte genen zaten onder andere transcriptiefactoren waarvan bekend was dat ze een rol spelen bij het behoud van pluripotentie in vroege embryo's en diens stamcellen. Genen die opgereguleerd zijn in tumoren dragen bij aan het behoud van het ES-cel fenotype en de snelle proliferatie van diezelfde cellen in vitro. Deze genen werden mede betrokken in het onderzoek. Tevens hebben Yamanaka en Takahashi verschillende genen geïdentificeerd die in ES-cellen tot expressie komen. Van al deze genen werd onderzocht of ze pluripotentie konden induceren in somatische muizencellen. Door middel van een assay werd pluripotentie gedetecteerd als resistentie tegen het antibioticum G418. Door retrovirale transductie werd elk van de 24 genen in een embryonale muizenfibroblast geïntroduceerd, geen enkele fibroblast had resistentie ontwikkeld. Dit impliceert dat geen van de genen op zichzelf pluripotentie kan induceren. Transductie van de 24 genen zorgde voor 22 resistente kolonies. Na het selecteren van kolonies op basis van morfologie en genexpressie, werden de genen één voor één uitgeschakeld, zodat kon worden gededuceerd welke verantwoordelijk waren voor de pluripotentie. Er werden geen resistente kolonies gevonden na het weghalen van Oct3/4 of Klf4. Wanneer Sox2 werd verwijderd uit de gebruikte factoren resulteerde dat in een paar resistente kolonies. Door het verwijderen van c-Myc werden wel kolonies gevormd, maar deze hadden een plattere morfologie, niet conform aan de morfologie van de ES-cel. Deze resultaten suggereerden dat eerder genoemde factoren, Oct3/4 Klf4 Sox2 en c-Myc een cruciale rol spelen bij het induceren van pluripotentie in fibroblasten van muizen (Takahashi & Yamanaka, 2006). Opmerkelijk was dat de transcriptiefactor

Nanog niet ontbeerlijk was, eerder was aangetoond dat dit eiwit cruciaal was voor het behoud van pluripotentie (Loh *et al.*, 2006 in Takahashi & Yamanaka, 2006). Chambers *et al.* (2007) hebben ontdekt dat Nanog niet onmisbaar is voor de expressie van somatische pluripotentie en zelfs cruciaal is bij het construeren van de *ICM* en kiemcellen (Chambers *et al.*, 2007). c-Myc en Klf4 zijn essentieel voor het induceren van pluripotentie. Geen van beiden kon vervangen worden door oncogenen zoals E-Ras, Tcl1, beta-catenine of Stat3. c-Myc is een oncogen, een gen dat een tumor kan veroorzaken als het muteert. c-Myc heeft vele downstream effectoren die verantwoordelijk zijn voor het genereren van de iPS-cellen. Het eiwit is betrokken bij de acetylering van histonen waardoor Sox2 en Oct3/4 aan hun loci kunnen binden. Klf4 is een tumor-gerelateerde factor wiens expressie verandert in de aanwezigheid van een tumor. In een ES-cel onderdrukt klf4 p53, een tumorsuppressor die de expressie van Nanog onderdrukt. Klf4 zorgt dus voor de activering van Nanog en het behoud van de pluripotentie (Yamanaka & Takahashi, 2006). Één jaar na het baanbrekende artikel verscheen van dezelfde groep het bewijs dat de vier factoren bij humane cellen pluripotentie kunnen induceren (Takahashi *et al.*, 2007). In die publicatie wordt gezegd dat de iPS-cellen sterk lijken op embryonale stamcellen qua morfologie en genexpressie. In een review van Hochedlinger en Plath (2009) wordt becommentarieerd hoe Yamanaka en Takahashi de iPS-cellen hebben geselecteerd. Studies wijzen uit dat een selectie gebaseerd op promotors van Oct4 of Nanog leidt tot de identificatie van cellen met een hogere ES-cel gelijkenis (Hochedlinger & Plath, 2009). Sinds de publicatie van de Yamanaka-factoren zijn er veel artikelen verschenen waarin variaties op het originele recept pluripotentie induceren. Tevens werd er veel geschreven over de rol van de aparte Yamanaka-factoren. In de volgende paragraaf komt een selectie van dergelijk onderzoek kort aan bod.

### 2.3.2 Variaties & Aanpassingen

In 2008 werd een artikel gepubliceerd dat claimde dat c-Myc niet nodig was voor het induceren van pluripotentie (Wernig *et al.*, 2008). Deze bevinding werd verwelkomd, aangezien veel van de dieren die uit iPS-cellen zijn ontstaan uiteindelijk tumoren ontwikkelden door de reactivering van c-Myc (Okita *et al.*, 2006 in Wernig *et al.*, 2008). In het onderzoek werd beschreven dat wanneer c-Myc weg werd gelaten er nog steeds pluripotentie bereikt kon worden, al was het met een substantiële vertraging. De zelfregulerende lus die verantwoordelijk is voor de pluripotentie werd langzamer en minder efficiënt geactiveerd dan wanneer c-Myc bij de herprogrammerende factoren werd toegevoegd (Wernig *et al.*, 2008). Een mogelijk alternatief voor het oncogen c-Myc is het gebruik van LIN28. Dit RNA-bindend eiwit heeft bij herprogrammeren dezelfde functie als c-Myc (Plath & Hochedlinger, 2009).

Utikal en collega's toonden in 2009 aan dat pluripotentie zonder de transcriptiefactor Sox2 bereikt kan worden bij melanocyten en neurale voorlopercellen. Bij de primaire melanocyten van muis en mens is de efficiëntie lager dan wanneer er herprogrammeerd wordt met de vier factoren. Bij de neurale voorlopercellen was de efficiëntie juist hoger in afwezigheid van Sox2. Dit toont aan dat cellen met een hoog endogeen gehalte aan Sox2 gevoeliger zijn voor de ectopische expressie van Sox2. Deze verhoogde sensitiviteit zorgt voor toxiciteit of de inductie van differentiatie (Utikal *et al.*, 2009).

Ondanks de kritiek worden iPS-cellen nog steeds geproduceerd met behulp van Oct4 en Sox2, in combinatie met c-Myc en Klf4 of LIN28 en Nanog (Yamanaka & Takahashi, 2006; Takahashi *et al.*, 2007; Hochedlinger & Plath, 2009; Hanley *et al.*, 2010; Hanna *et al.*, 2010). De overlap van de gebruikte transcriptiefactoren wordt veroorzaakt door hun specifieke bindingseigenschappen. Doordat er een hoge onderlinge verbondenheid bestaat bij de manier waarop ze aan het DNA binden, ontstaat er een coöperatieve werking en overtuigendheid tussen de vier factoren (Hanna *et al.*, 2010). Wanneer Sox2, Oct4 en Nanog tot overexpressie worden gebracht in fibroblasten activeren ze een zelfregulerende lus. De factoren binden aan alle drie de promotors zodat elk van de drie transcriptiefactoren zichzelf en tegelijkertijd de andere twee



promoot. Deze lus zorgt voor het stabiliseren van de genexpressie en het vergemakkelijkt het behoud van de pluripotente staat. Tevens binden Sox2, Oct4 en Nanog vaak aan dezelfde genen. Eén groep van deze genen wordt actief tot expressie gebracht en bevat onder andere de transcriptiefactoren, chromatine-modificerende enzymen en signalerende eiwitten die nodig zijn voor het behoud van de pluripotente staat en zelfvernieuwing. De tweede groep genen wordt onderdrukt maar blijft paraat voor snelle expressie wanneer deze nodig is. Deze groep bevat ontwikkelingstranscriptiefactoren die tot expressie komen bij differentiatie en de specificatie van cellijnen. Ondanks de onderdrukte staat van deze genen zijn er RNA polymerases II gebonden aan de promotoren. De transcriptie wordt wel ingezet maar niet geëlongeerd door de onderdrukkende werking van PcG-eiwitten en nucleosomen. Door de aanwezigheid van de polymerases kunnen de ontwikkelingsgenen afgeschreven worden zodra de cel pluripotentie verliest en diferentieert naar een specifiek type (Jaenisch & Young, 2008 en Boyer *et al.*, 2005 en Boyer *et al.*, 2006).

Stadtfeld en collega's (2008) toonden aan dat bij het herprogrammeren van muizenfibroblasten de expressie van de vier factoren 10 dagen nodig is. Daarna kan het somatische genoom, zonder externe invloed, omgezet worden naar pluripotentie. Herprogrammeren is geen willekeurige maar een vaste opvolging van moleculaire gebeurtenissen. Eerst wordt de downregulatie van de fibroblastmarkers verwezenlijkt, waarna de ES-cel marker SSEA-1 langzaam wordt geactiveerd. Wanneer de cellen doxycycline-afhankelijk zijn worden onder andere Oct4, Sox2, telomerase en het gesilencete X-chromosoom gereactiveerd. Op de derde dag wordt het Fbx15-gen geactiveerd, nog voor de reactivering van pluripotentiegenen Nanog en Oct4. Hierdoor lijken iPS-cellen die worden geselecteerd op Fbx15 onvolledig herprogrammeerd. Vier dagen na inductie vindt stapsgewijs het retrovirale silencen plaats. De transcriptiefactoren die door middel van het retrovirus de cel zijn binnengekomen worden uitgeschakeld. Aangezien de factoren die zelfregulerende lus hebben geactiveerd zijn de exogene factoren niet meer nodig (Jeanisch & Young, 2008). Daarnaast wordt Dnmt3a in de vroege fases opgereguleerd. In de latere stades worden de methyltransferase Dnmt3b en de retrovirale silencing factor TRIM28 actiever. Retroviraal silencen wordt vroeg in het proces geïnitieerd maar laat vervolledigd, tegelijkertijd met de activering van epigenetische regulators en de pluripotentie genen (Stadtfeld *et al.*, 2008). De iPS-cellen van muizen en mensen hebben dit proces gemeenschappelijk, het wordt gezien als een indicatie van een succesvolle inductie van de pluripotente staat (Djuric & Ellis, 2010). Het vertonen van retroviraal silencen is niet genoeg om een cel als pluripotent te classificeren. Meerdere markers zijn hiervoor nodig, namelijk de criteria gedicteerd door de Gouden Standaard die in het volgende hoofdstuk wordt besproken.

## Hoofdstuk 3 Moleculaire eigenschappen van ES- en iPS-cellen

Voor er antwoord kan worden gegeven op de vraag of iPS-cellen een veilig alternatief voor embryonale stamcellen zijn, moeten de verschillen en gelijkenissen tussen de twee celsoorten in detail bekeken worden. De aanwezigheid van verschillen zou de therapeutische potentie van iPS-cellen kunnen beïnvloeden.

In dit hoofdstuk wordt eerst gekeken naar de manier waarop pluripotentie wordt vastgesteld, aan welke criteria voldaan moeten worden voor de testcel als pluripotent wordt bestempeld. Daarna komen drie belangrijke moleculaire aspecten aan bod; namelijk de genexpressie, de chromatinestructuur en het epigenetisch geheugen van de testcel. Door deze te vergelijken met de eigenschappen van de ES-cel kan worden gekeken in hoeverre de genomen overeenkomen.

### 3.1 De Gouden Standaard

Er zijn meerdere criteria waarmee de potentie van een geïnduceerde testcel kan worden bepaald. De 'Gouden Standaard' biedt een raamwerk voor de functionele vergelijking van iPS-cellen met ES-cellen. Het eerste waar naar wordt gekeken is de *in vitro* differentiatie van de cel. De morfologie van de cel wordt bestudeerd, waaronder de aanwezigheid van celspecifieke markers en de grootte van de cel. Daarna wordt gekeken of de cel een teratoma, een tumor bestaande uit meerdere weefseltypes, kan vormen. Teratomavorming demonstreert dat de cel tot meerdere cellijn kan differentiëren en dus pluripotent is. Aangezien teratomavorming geen bewijs is van normale differentiatie wordt onderzocht of de cel een chimera kan vormen. Hierbij wordt de cel in een blastocyst van een muis geïnjecteerd. Een gezonde muis ontstaat alleen als de geïnjecteerde cel heeft bijgedragen aan de normale ontwikkeling van het diertje. Als dit het geval is wordt er gekeken of de cel functionele kiemcellen kan produceren. De laatste en meest nauwkeurige test bestaat uit het vormen van een gezonde muis na injectie in een tetraploïde blastocyst. Omdat een tetraploïde blastocyst zelf geen somatische cellen kan genereren bestaat het resulterende muisje alleen uit cellen afkomstig van de geïnjecteerde cel (Jaenisch & Young, 2008).

### 3.2 Moleculaire eigenschappen

De chromatinestructuur, genexpressie en het epigenetisch geheugen hebben behalve invloed op de pluripotentie ook invloed op elkaar. De genexpressie wordt sterk beïnvloed door de specifieke chromatinestructuur. Hoe losser het DNA om de histonen zit gewikkeld, des te makkelijker die DNA-sequentie bereikt en afgeschreven kan worden. Tevens spelen de methylering en acetylering van de histonen waar het DNA om gebonden zit een grote rol. Doorgaans zijn gemethyleerde genen niet actief terwijl acetylering over het algemeen duidt op een actief gen.

Deze structuurveranderingen kunnen worden doorgegeven aan de dochtercellen mits ze stabiel zijn. Op deze manier wordt het genexpressieprofiel en daarmee de celidentiteit van de moedercel behouden. Deze vorm van overerving is epigenetisch, onafhankelijk van de DNA-sequentie, en het patroon wordt ook aan nakomelingen doorgegeven (Alberts *et al.*, 2008 & Egger *et al.*, 2004).

#### 3.2.1 Genexpressie

De vergelijkende analyse van de expressieprofielen van verschillende celtypes wordt tegengewerkt door de verschillen in homogeniteit van celpopulaties, reagenten en analytische technieken (Guenther *et al.*, 2010). Het is daarom van belang om methodes te gebruiken die deze ruis in beschouwing nemen, zodat de juiste conclusies worden getrokken (Bammler *et al.*, 2005 in Guenther *et al.*, 2010).

Het eerste grote verschil tussen de twee celsoorten is logischerwijs de locatie van ontwikkeling: geïnduceerde stamcellen worden *in vitro* gekweekt terwijl embryonale cellen *in vivo* groeien. De groei en de moleculaire karakteristieken van de geïnduceerde cellen zijn het product

van een selectie op snelle in vitro proliferatie. Dit resulteert in cellen die epigenetisch en biologisch verschillen van hun cellen van oorsprong (Jaenisch & Young, 2008). De vraag is of deze verschillen relevant zijn voor het onderzoek naar het therapeutisch gebruik van iPS-cellen.

In 2007 publiceerden Takahashi *et al.* dat de humane geïnduceerde pluripotente stamcellen qua chromatinestructuur en expressieprofiel sterk op embryonale stamcellen lijken (Takahashi *et al.*, 2007). Twee jaar later verscheen er een artikel dat het tegendeel meende bewijzen. Chin *et al.* (2009) concludeerden dat relevante verschillen aanwezig waren tussen iPS- en ES-cellen qua miRNA-expressie. De iPS-cellen hebben een uniek profiel en zijn te onderscheiden van embryonale stamcellen (Chin *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2009 in Chin *et al.*, 2009).

In 2010 hebben Newman en Cooper de gegevens van Chin *et al.* opnieuw geanalyseerd. Uit hun onderzoek kwam naar voren dat de 15 genen die Chin *et al.* hadden gevonden geen consistente up- of downregulatie vertoonden en dat maar 15 tot 50% van de honderden genen overlap hadden tussen de verschillende laboratoria. Newman en Cooper concludeerden dat de gevonden expressieverschillen stochastisch, oftewel onvoorspelbaar en lab-specifiek moesten zijn. Dit soort variaties worden veroorzaakt door bijvoorbeeld het herprogrammeren, de gebruikte voorlopercellen, eigenschappen van het micromilieu of een combinatie van deze factoren (Newman & Cooper, 2010). Eveneens Guenther en diens collega's kwamen tot dezelfde conclusie. De overlap van de genen tussen de laboratoria was dermate laag dat er qua genexpressie zeer weinig tot geen consistente verschillen aanwezig waren tussen de twee pluripotente lijnen (Guenther *et al.*, 2010). Hierop kwamen Chin en collega's met een artikel waarin twee studies werden aangehaald die hun originele conclusie ondersteunden. In het onderzoek van Marchetto *et al.* (2009) werd pluripotentie geïnduceerd bij neurale voorlopercellen. Deze cellen waren nog te onderscheiden van embryonale stamcellen: de specifieke genen van neurale stamcellen waren onvoldoende onderdrukt en de embryonale genen waren onvolledig geïnduceerd. Kortom, de cellen hadden een afwijkend genexpressieprofiel. Voor dit onderzoek was gebruik gemaakt van episomale vectoren die pluripotentie induceerden in één enkele cellijn. In de discussie van het artikel werd vermeld dat de conclusies van het onderzoek hierdoor beperkt zijn en dat de effecten van de bevonden verschillen onbekend en mogelijk irrelevant zijn (Marchetto *et al.*, 2009). Chin en collega's laten deze kanttekening weg uit hun artikel. Tevens geeft het tweede artikel dat wordt aangehaald aan dat hun data resultaat kunnen zijn van stochastische variaties (Ghosh *et al.*, 2010). Dit is dezelfde conclusie die Guenther *et al.* (2010) trokken over de resultaten van Ghosh (2010) en Marchetto (2009), en die Newman en Cooper (2010) trokken over het originele onderzoek van Chin en collega's (2009). In wezen wordt de indruk gewekt dat Chin *et al.* (2010) op een niet wetenschappelijk verantwoorde manier conclusies hebben getrokken uit desbetreffende artikelen.

Data uit Guenther's onderzoek impliceren dat er wel degelijk verschillen bestaan, echter dat deze niet consistent bewijzen dat de embryonale stamcellen qua pluripotentie van de geïnduceerde soort verschillen (Guenther *et al.*, 2010). Stadtfeld en collega's toonden verschillen aan qua mRNA- en miRNA-expressie bij muizencellen. Het is nog onbekend of deze verschillen ook bij de humane cellen aanwezig zijn (Stadtfeld *et al.*, 2010).

Ondanks het wetenschappelijk getouwtrek lijkt er een aanvaarde consensus bereikt te zijn. De genexpressieprofielen van embryonale stamcellen en iPS-cellen zijn nagenoeg hetzelfde. Naar de relevantie van de aanwezige verschillen moet meer onderzoek gedaan worden.

### 3.2.2 Chromatinestructuur

Behalve de genexpressie speelt de chromatinestructuur een zeer grote rol in de pluripotentie van cellen. De manier waarop DNA gewikkeld wordt is mede verantwoordelijk voor de genexpressie. In embryonale stamcellen is chromatine rond actieve genen getrimethyleerd op de vierde lysine van histon 3 (H3K4me3) (Meissner *et al.*, 2008). Deze trimethylering wordt gekatalyseerd door trithorax-groep complexen op promotoren van onder andere eiwit-coderende genen (Guenther *et al.*, 2007 in Guenther *et al.*, 2010). De genen die onderdrukt worden, de ontwikkelingsgenen, zijn

getrimethyleerd op lysine 27 van histon 3, door PcG-eiwit complex PRC2 (Schuettengruber *et al.*, 2007 in Guenther *et al.*, 2010). In het onderzoek naar verschillen en/of gelijkenissen op het gebied van chromatinestructuur wordt voornamelijk naar deze twee markers gekeken.

Het onderzoek van Guenther *et al.* (2010) leidde tot de conclusie dat er weinig tot geen consistente verschillen zijn in de genengroep die door H3K4me3 of H3K27me3 bezet worden van iPS-cellen en ES-cellen. Tevens zijn de locaties van histontrimethylering op lysines 4 en 27 bijna hetzelfde bij eiwit- en niet-coderende genen in al de onderzochte ES- en iPS-cellijnen (Guenther *et al.*, 2010). Behalve Guenther *et al.* komen meerdere onderzoeken tot dezelfde conclusie. Hochedlinger en Plath claimen dat iPS-cellen histonmethyleringspatronen nagenoeg niet te onderscheiden zijn van de patronen van ES-cellen (Hochedlinger & Plath, 2009). Over de chromatinestructuur is niet zo veel debat als over de genexpressie, de heersende mening is dat qua trimethylering iPS-cellen sterk op ES-cellen lijken (Mikkelsen *et al.*, 2008).

Bij een klein aantal regio's blijft er sprake van minieme verschillen. Deze verschillen betreffen een klein deel van het genoom en hebben weinig tot geen effect op de genexpressie. Echter kan er niet worden uitgesloten dat deze kleine verschillen subtiele effecten hebben op celdifferentiatie (Guenther *et al.*, 2010).

### 3.2.3 Epigenetisch geheugen

In het artikel van Ghosh en collega's (2010) wordt geclaimd dat geïnduceerde stamcellen niet gelijk zijn aan embryonale stamcellen wanneer het op de genexpressie aankomt. De reden hiervoor is volgens de schrijvers het fenomeen van epigenetisch geheugen. Dit houdt in dat herprogrammeerde stamcellen een epigenetisch profiel hebben dat gedeeltelijk overeen komt met die van het weefsel van oorsprong. Aangezien herprogrammeren alleen op het genetische niveau plaats vindt kunnen celspecifieke chromatineveranderingen achterblijven. Guenther (2010) en Newman & Cooper (2010) beweerden dat de conclusies van Ghosh *et al.* (2010) foutief getrokken waren. Maherali *et al.* (2007) en Mikkelsen *et al.* (2008) vonden na analyses van iPS-cellen van fibroblasten geen afwijkingen die duiden op een epigenetisch geheugen. Toch verscheen er in *Nature* een artikel dat de aanwezigheid van het epigenetisch geheugen lijkt te ondersteunen. Kim *et al.* (2010) observeerden dat iPS-cellen die geproduceerd waren door middel van transcriptiefactoren een methyleringspatroon hadden dat leek op die van het weefsel van oorsprong. Hierdoor differentiëren deze cellen makkelijker binnen de cellijn van de donorcel. Opmerkelijk genoeg is er bij cellen gegenereerd door somatische celkerntransfer geen sprake van dit soort geheugen. Celkerntransfer leidt tot een stabielere staat van pluripotentie dan herprogrammeren door middel van factoren (Kim *et al.*, 2010). Dat de geïnduceerde stamcel eigenschappen behoudt van het weefsel van oorsprong betekent niet dat deze cellen daardoor onbruikbaar zijn voor therapieën of onderzoek. De enige beperking van deze cellen is dat ze niet naar een andere cellijn kunnen differentiëren (Kim *et al.*, 2010). Ten bate van onderzoek naar ziekteprogressie doen ze niet onder voor embryonale stamcellen, aangezien het weefsel van oorsprong tegelijkertijd het onderzochte weefsel is. Tevens zou het epigenetisch geheugen gecorrigeerd kunnen worden door de cellen met drugs te behandelen die de chromatinestructuur veranderen of door differentiatie en stapsgewijs herprogrammeren (Kim *et al.*, 2010). Zelfs na substantiële ontregeling van het genoom van ES-cellijnen ontwikkelen deze zich volledig, wat impliceert dat differentiatie tolerant is voor epigenetische afwijkingen en subtiele abnormaliteiten in genexpressie (Hanna *et al.*, 2010). Alsnog zijn criteria nodig die de veiligheidsmarge van afwijkingen bepalen, zodat de veiligheid bij onderzoek en therapieën gewaarborgd blijft.

## Hoofdstuk 4 Problemen met de iPSC-productie

In het vorige hoofdstuk werd duidelijk dat de geïnduceerde stamcellen sterk lijken op embryonale stamcellen, maar dat het al dan niet subtiele effect van de kleine verschillen verder onderzocht moeten worden. Helaas zijn er meer moeilijkheden te omzeilen bij de productie van iPSC-cellen. In dit hoofdstuk worden twee belangrijke hindernissen voor het therapeutisch gebruik van iPSC-cellen onderlijnd.

Het werken met stamcellen is altijd riskant omdat delende en niet-differentiërende cellen een risico op tumorontwikkeling met zich meebrengen. Dit risico is een cruciaal punt van aandacht en meerdere artikelen omtrent mogelijkheden voor de productie van stamcellen zonder kankerverwekkende neveneffecten zijn gepubliceerd. De carcinogeniteit wordt niet alleen veroorzaakt door inherente karakteristieken van geïnduceerde stamcellen, maar ook de manier waarop pluripotentie wordt geïnduceerd kan tumorvorming veroorzaken. De eerste experimenten gebruikten retrovirussen voor het induceren van pluripotentie, dit bleek met verscheidene problemen gepaard te gaan. In de eerste paragraaf wordt dieper ingegaan op dit carcinogene probleem, waarvoor inmiddels meerdere oplossingen zijn gevonden. Daarna wordt de efficiëntie van het herprogrammeren besproken. Bij alle drie de mogelijke methodes is dit een groot obstakel, omdat van duizenden begincellen er maar enkele worden geherprogrammeerd tot pluripotentie.

### 4.1 Kanker

De carcinogeniteit van het proces van pluripotentie-inductie wordt mede bepaald door de activering van c-Myc, een bekend oncogen. In 2008 werden twee artikelen gepubliceerd waaruit duidelijk werd dat zonder c-Myc iPSC-cellen gegenereerd kunnen worden. Wernig *et al.* (2008) hebben aangetoond dat voor de productie van muizen iPSC-cellen c-Myc weg kan worden gelaten. Alleen was het proces van de omzetting naar pluripotente stamcel erg vertraagd en lag de efficiëntie een factor tien tot honderd lager dan in de aanwezigheid van c-Myc. De fibroblasten die uit de c-Myc-negatieve iPSC-cellen groeiden waren niet te onderscheiden van de c-Myc+ tegenhangers (Wernig *et al.*, 2008). Het artikel van Nakagawa en collega's beschrijft de omzetting van dermale fibroblasten naar iPSC-cellen zonder c-Myc. Het proces is minder efficiënt, langzamer maar wel specifieker dan in aanwezigheid van de transcriptiefactor. De muizen die uit de iPSC-cellen zonder c-Myc groeiden ontwikkelden geen tumoren tijdens de duur van het onderzoek. De productie van humane iPSC-cellen was evenals die van muis iPSC-cellen minder efficiënt en specifieker. De auteurs zeggen nadrukkelijk dat hun resultaten niet aangeven dat c-Myc overbodig is voor het proces bij humane cellen (Nakagawa *et al.*, 2008).

Naast het oncogen c-Myc speelt de tumorsuppressor p53 een rol bij de ontwikkeling van kanker. Dit eiwit houdt tumorvorming tegen door apoptose in te zetten bij cellen die stress waarnemen. Kawamura *et al.* (2009) kwamen met het bewijs dat door de vermindering van p53-niveau's de efficiëntie van de iPSC-productie vergroot wordt. Het reduceren van de signalen naar p53 kan worden bereikt op verschillende manieren, waaronder het tot expressie brengen van een gemuteerde vorm van een negatieve regulator of simpelweg het wissen van p53 of p21. Door het verminderen van de concentratie aan p53 konden fibroblasten met behulp van alleen Oct4 en Sox2 tot iPSC-cellen omgezet worden (Kawamura *et al.*, 2009). Krizhanovskiy en Lowe waarschuwen dat het uitschakelen van p53 tot een instabiel genoom en mogelijk kanker leidt. De risico's van het produceren van iPSC-cellen zonder de tumorsuppressor kan juist averechts uitpakken (Krizhanovskiy & Lowe, 2009). Hong *et al.* (2009) stellen dat de permanente uitschakeling van p53 inderdaad genomische instabiliteit en lagere iPSC-celkwaliteit tot gevolg heeft. Niettemin kan de tijdelijke onderdrukking van p53 worden toegepast voor het efficiënter ontwikkelen van integratie-vrije iPSC-cellen (Hong *et al.*, 2009). De retrovirale integratie van de factoren is namelijk de tweede manier waardoor kanker kan ontstaan bij de productie van iPSC-cellen.

Het gebruik van retrovirussen leidt tot willekeurige integratie van exogene sequenties in het genoom van de gastcel. Yamanaka *et al.* (2007) kaarten de hierdoor veroorzaakte problemen aan in hun artikel over iPS-celproductie van humane cellen. Ze vonden in elke iPS-cel drie tot zes integraties per herprogrammerende factor. Uiteindelijk had elke kloon meer dan 20 integratiesites, wat het risico op tumorgenese aanzienlijk verhoogde (Yamanaka *et al.*, 2007). Tevens bestaat de kans dat de retrovirale transgenen spontaan worden gereactiveerd (Okita *et al.*, 2007). In 2008 kwamen Stadtfeld *et al.* met een nieuwe procedure om de factoren te induceren zonder retrovirale insertie. Zij maakten gebruik van niet-integrerende adenovirussen die Oct4, Sox2, Klf4 en c-Myc tijdelijk tot expressie brachten. De resultaten van het onderzoek toonden aan dat retrovirale insertie niet noodzakelijk is voor het verkrijgen van iPS-cellen (Stadtfeld *et al.*, 2008). Uiteindelijk bleken virale vectoren passé: Okita *et al.* (2008) produceerden iPS-cellen door middel van plasmiden. Herhaaldelijke transfectie van twee plasmiden, waarvan één het cDNA van Oct4, Sox2 en Klf4 bevat en de andere het c-Myc cDNA, resulteerde bij embryonale muizenfibroblasten in iPS-cellen (Okita *et al.*, 2008). Meerdere artikelen geven aan dat pluripotentie bereikt kan worden zonder het gebruik van virussen.

In 2009 kwamen Kaji en collega's met een manier om bij humane cellen pluripotentie te induceren met behulp van een expressievector. Deze vector bevatte de coderende sequenties van Oct4, Sox2, Klf4 en c-Myc die gekoppeld waren aan 2A-peptiden. Na het bereiken van herprogrammeren kon het transgen worden verwijderd, zodat de kans op spontane reactivering genihileerd werd. Door het weghalen van de exogene factoren en de minimale genoommodificaties zijn de geproduceerde iPS-cellen toepasbaar in regeneratieve therapieën, het screenen van drugs en het vaststellen van ziektemodellen (Kaji *et al.*, 2009).

Zhou en collega's (2009) hebben met behulp van eiwitten pluripotentie geïnduceerd bij muizencellen. Door de vier welbekende factoren met de C-terminus te fuseren aan een cel-penetrerend eiwit brachten de onderzoekers de factoren de cel binnen (Zhou *et al.*, 2009). Kim *et al.* (2009) hebben ook door middel van eiwitten pluripotentie weten te bereiken. Deze techniek omzeilt beperkingen van procedures die gebaseerd zijn op veranderingen van het DNA, maar is nog inefficiënt en heeft optimalisering nodig. De concentratie aan factoren werd beperkt door de gebruikte proteïnen, dit kan worden verbeterd door het gebruik van gezuiverde factoren, aldus Kim *et al.* (2009). Deze procedure verschilt van die uitgevoerd door Zhou *et al.* (2009) op het gebied van de gebruikte herprogrammerende factoren, en de aanwezigheid van VPA (Kim *et al.*, 2009). Yamanaka (2009) waarschuwt voor de aanwezigheid van chemicaliën zoals VPA aangezien deze mutaties kan induceren.

Een paar maanden geleden werd er in *Cell Stem Cell* een artikel gepubliceerd waarin door middel van miRNA's pluripotentie werd bereikt bij muizen- en humane cellen (Miyoshi *et al.*, 2011). De onderzoekers hadden drie miRNA's geselecteerd die betrokken zijn bij de controle van genen verantwoordelijk voor pluripotentie bij embryonale muizenstamcellen. De drie miRNA's mir-200c, mir-302s en mir-369s konden alleen samen pluripotentie realiseren. Deze drie miRNA's werden in adipose stromale muizencellen geïntroduceerd. Dertig dagen na de behandeling waren onder andere Sox2, Oct4 en Nanog tot expressie gekomen, genen kenmerkend voor een pluripotente staat. Bij humane cellen werden dezelfde miRNA's in adipose stromale cellen en dermale fibroblasten geïntroduceerd met hetzelfde resultaat. Aangezien deze pluripotente stamcellen zijn geproduceerd door directe transfectie van volwassen miRNAs, wordt wederom het probleem van genomische instabiliteit omzeild. Ongelukkigerwijs is ook bij deze techniek de efficiëntie zeer laag (Miyoshi *et al.*, 2011).

## 4.2 Efficiëntie

Bij alle bekende methodes is het een consistent gegeven dat alleen een kleine fractie van de donorcellen geherprogrammeerd worden. De test voor efficiëntie wordt meestal op een willekeurig moment gedaan, waarbij de cellen worden geteld die een iPSC-achtig fenotype vertonen, dit aantal

wordt gedeeld door het aantal begincellen (Hanna *et al.*, 2010). Hanna en collega's leggen verder uit dat het berekenen van de efficiëntie op deze manier gelimiteerde kennis oplevert. Het is namelijk moeilijk om de extensieve uitbreiding en/of apoptose van de begincellen te kwantificeren. De embryonale muizenfibroblasten die in de meeste experimenten worden gebruikt hebben een sterk verschillende aanleg voor immortalisatie en tolerantie tegen de ectopische expressie van exogene factoren. Tevens kunnen individuele klonen zusterklonen van dezelfde begincel zijn, waardoor de uitkomst van de berekening niet meer klopt. Hockemeyer en collega's (2008) bedachten een stapsgewijze inductie van pluripotentie met behulp van doxycycline waar de efficiëntie rond de 5-10% lag (Hockemeyer *et al.*, 2008). De efficiëntie van het directe herprogrammeren van een somatische cel naar een iPSC-cel door middel van virussen ligt tussen de 0,005-0,1%. Er is dus een aanzienlijke stijging in efficiëntie, wat er op kan duiden dat virale infectie een effect heeft op de efficiëntie (Hochedlinger & Plath, 2009). Maherali en collega's (2008) toonden aan dat de frequentie van iPSC-productie met behulp van doxycycline toegenomen is van 1% tot 3% (Maherali *et al.*, 2008).

De efficiëntie van de inductie van pluripotentie hangt samen met de oorsprong van de begincel, minder ver gedifferentieerde cellen zijn eenvoudiger terug te schakelen naar pluripotentie. Meerdere factoren waaronder de celcyclus en fysieke karakteristieken van de celkern bepalen de efficiëntie van het herprogrammeren en moeten onderzocht worden (Jaenisch & Young, 2008).

## Hoofdstuk 5 Conclusie

Bij comperatief onderzoek moet rekening worden gehouden met het feit dat niet alle onderzoeken noodzakelijk dezelfde soort stamcellen gebruiken. Bij Guenther werden de stamcellen via een drug-inducible system geproduceerd, terwijl Marchetto en collega's een andere procedure gebruikten. Dit kan zorgen voor onderlinge verschillen in genexpressieprofielen of chromatinestructuur, die niet per se de geïnduceerde pluripotente stamcel van de embryonale stamcel onderscheiden. Tevens kan de 'beginncel' per onderzoek verschillen; voornamelijk worden fibroblasten gebruikt, maar ook neurale progenitorcellen worden herprogrammeerd.

Al met al kan geconcludeerd worden dat iPS-cellen sterk op ES-cellen lijken, maar dat de kleine verschillen beter onderzocht moeten worden. Er moet worden gekeken naar het effect van de celcyclus en de fysieke karakteristieken van de kern op de efficiëntie van het herprogrammeren. Tevens moet meer onderzoek gedaan worden naar het effect van het epigenetisch geheugen en de kleine verschillen qua genexpressieprofiel op de verdere differentiatie van de iPS-cel.

Voorzichtigheid is de moeder der wijsheid: bij de ontwikkeling van nieuwe therapieën is zorgvuldigheid altijd aan te raden, zeker bij een onderzoeksveld dat zo controversieel is als dit. Het stamcelonderzoek heeft al eerder geleden onder onterecht optimisme. Voor het behoud van het onderzoek is het van levensbelang om de cellen te perfectioneren alvorens resultaten te presenteren aan het grote publiek. Tientallen artikelen per jaar worden gepubliceerd omtrent dit onderwerp, een jarenlang proces zal het niet worden. Aangezien de genexpressie, de chromatinestructuur en het epigenetische geheugen een grote overlap hebben betekent meer onderzoek naar een van de drie meer onderzoek naar de rest van de groep. Meer onderzoek omtrent epigenetisch geheugen zorgt ook voor verduidelijking van het belang van de al dan niet aanwezige verschillen genexpressieprofielen. Hoe dan ook lijkt het wijsheid om langer en meer onderzoek te doen alvorens de iPS-cellen toe te passen als therapie.



## Referentielijst

- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (2008) *Molecular Biology of the Cell*. New York : Garland Science.
- Borge, Ole Johan & Evers, Kathinka (2003) Aspects on Properties, Use and Ethical Considerations of Embryonic Stem Cells – a Short Review. *Cytotechnology*, 41: 59-68.
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., Young, R. A. (2005) Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell*, 122: 947-956.
- Boyer, L. A., Mathur, D., Jaenisch, R. (2006) Molecular Control of Pluripotency. *Current Opinion in Genetics and Development*, 16(5): 455-462.
- Briggs, R., Kings, T. J. (1952) Transplantation of Living Nuclei from Blastula Cells into Enucleated Fogs' Eggs. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 38(5): 455-463.
- Brivanlou, A. H., Gage, F. H., Jaenisch, R. (2003) Setting Standards for Human Embryonic Stem Cells. *Science*, 300 (5621): 913-915.
- Chambers, I., Silva, J., Colby, D., Nichols, J., Nijmeijer, B., Robertson, M., Vrana, J., Jones, K., Grotewold, L., Smith, A. (2007) Nanog Safeguards Pluripotency and Mediates Germline Development. *Nature*, 450: 1230-1235.
- Chin, M. H., Mason, M. J., Xie, W., Volinia, S., Singer, M., Peterson, C., Ambartsumyan, G., Aimiwi, O., Richter, L., Zhang, J., Khvorostoy, I., Ott, V., Grunstein, M., Lavon, N., Benvenisty, N., Croce, C. M., Clark, A. T., Baxter, T., Pyle, A. D., Teitell, M. A., Pelegri, M., Plath, K., Lowry W. E. (2009) Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells Are Distinguished by Gene Expression Signatures. *Cell Stem Cell*, 5(2): 111-123.

- Chin, M. H., Pellegrini, M., Plath, K., Lowry, W. E. (2010) Molecular Analyses of Human Induced Pluripotent Stem Cells and Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7: 263-269.
- Davis, R. L., Weintraub, H., Lassar, A. B. (1987) Expression of a Single Transfected cDNA Converts Fibroblasts to Myoblasts. *Cell*, 51: 987-1000.
- Denker, H-W. (2006) Potentiality of Embryonic Stem Cells: an Ethical Problem Even With Alternative Stem Cell Sources. *Journal of Medical Ethics*, 32: 665-671.
- Djuric, U. & Ellis, J. (2010) Epigenetics of Induced Pluripotency, the Seven-Headed Dragon. *Stem Cell Research & Therapy*, 1(3): 6 p.
- Egger, G., Liang, G., Aparicio, A., Jones, P. A. (2004) Epigenetics in Human Disease and Prospects for Epigenetic Therapy. *Nature*, 429(6990): 457- 463.
- Gearhart, John & Coutifaris, Christos (2011) In Vitro Fertilization, the Nobel Prize, and Human Embryonic Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 8 (1): 12-15.
- Ghosh, Z., Wilson, K. D., Wu, Y., Hu, S., Quertermous, T., Wu, J. C. (2010) Persistent Donor Cell Gene Expression among Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to Differences with Human Embryonic Stem Cells. *PLoS ONE*, 5(2): e8975.
- Graf, T., Stadtfeld, M. (2008) Heterogeneity of Embryonic and Adult Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3(5): 480-483.
- Guenther, M. G., Frampton, G. M., Soldner, F., Hockemeyer, D., Mitalipova, M., Jaenisch, R., Young, R. A. (2010) Chromatin Structure and Gene Expression Programs of Human Embryonic and Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7: 249-257.
- Hanley, J., Rastegarlar, G., Nathwani, A. C. (2010) An Introduction to Induced Pluripotent Stem Cells. *British Journal of Haematology*, 151: 16-24.

- Hartmann, B., Ekkernkamp, A., Johnen, C., Gerlach, J. C., Belfekroun, C., Küntscher, M. V. (2007) Sprayed Cultured Epithelial Autografts for Deep Dermal Burns of the Face and Neck. *Annals of Plastic Surgery*, 58(1): 70-73.
- Hochedlinger, K., Jaenisch, R. (2003) Nuclear Transplantation, Embryonic Stem Cells, and the Potential for Cell Therapy. *New England Journal of Medicine*, 349(3): 275.
- Hochedlinger, K., Jaenisch, R. (2006) Nuclear Reprogramming and Pluripotency. *Nature*, 441: 1061-1067.
- Hockemeyer, D., Soldner, F., Cook, E. G., Gao, Q., Mitalipova, M., Jaenisch, R. (2008) A Drug-Inducible System for Direct Reprogramming of Human Somatic Cells to Pluripotency. *Cell Stem Cell*, 3: 346-353.
- Hong, H., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Kanagawa, O., Nakagawa, M., Okita, K., Yamanaka, S. (2009) Suppression of Induced Pluripotent Stem Cell Generation by the p53-p21 Pathway. *Nature*, 460: 1132-1136.
- Humpherys, D., Eggan, K., Akutsu, H., Hochedlinger, K., Rideout III, W. M., Biniszkiwicz, D., Yanagimachi, R., Jaenisch, R. (2001) Epigenetic Instability in ES Cells and Cloned Mice. *Science*, 293: 95-97.
- Jaenisch, R., Young, R. (2008) Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming. *Cell*, 132: 567-582.
- Kawamura, T., Suzuki, J., Wang, Y. V., Menendez, S., Morera, L. B., Raya, A., Wahl, G. M., Belmonte, J. C. I. (2009) Linking the p53 Tumour Suppressor Pathway to Somatic Cell Reprogramming. *Nature*, 460: 1085-1086.
- Kaji, K., Norrby, K., Paca, A. (2009) Virus-Free Induction of Pluripotency and Subsequent Excision of Reprogramming Factors. *Nature*, 458: 771-775.
- Kim, .K, Doi, A., Wen, B., Ng, K., Zhao, R., Cahan, P., Kim, J., Aryee, M. J., Ji, H., Ehrlich, L. I. R., Yabuuchi, A., Takeuchi, A., Cunniff, K. C., Hongguang, H., Mckinney-Freeman, S.,

Naveiras, O., Yoon, T. J., Irizarry, R. A., Jung, N., Seita, J., Hanna, J., Murakami, P., Jeanisch, R., Weissleder, R., Orkin, S. H., Weissman, I. L., Feinberg, A. P., Daley, G. Q. (2010) Epigenetic Memory in Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature*, 467: 285:290.

Kleinsmith, L. J., Pierce Jr., G. B. (1964) Multipotentiality of Single Embryonal Carcinoma Cells. *Cancer Research*, 24: 1544-1551.

Krizhanovsky, V., Lowe, S. W. (2009) The Promises and Perils of p53. *Nature*, 460: 1085-1086.

Maherali, N., Ahfeldt, T., Rigamonti, A., Utikal, J., Cowan, C., Hochedlinger, K. (2008) A High-Efficiency System for the Generation and Study of Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 3(3): 340-345.

Maherali, N., Sridharan, R., Xie, W., Utikal, J., Eminli, S., Arnold, K., Stadtfeld, M., Yachenko, R., Tchieu, J., Jaenisch, R. (2007) Directly Reprogrammed Fibroblasts Show Global Epigenetic Reprogramming and Widespread Tissue Contribution. *Cell Stem Cell*, 1: 55-70.

Marchetto, M. C. N., Yeo, G. W., Kainohana, O., Marsala, M., Gage, F. H., Muotri, A. R. (2009) Transcriptional Signature and Memory Retention of Human-Induced Pluripotent Stem Cells. *PLoS ONE*, 4: 9.

Meissner, A., Mikkelsen, T. S., Gu, H., Wernig, M., Hanna, J., Sivachenko, A., Zhang, X., Bernstein, B. E., Nusbaum, C., Jaffe, D. B., Gnirke, A., Jaenisch, R., Lander, E. S. (2008) Genome-scale DNA Methylation Maps of Pluripotent and Differentiated Cells. *Nature*, 454(7205): 766-770.

Mikkelsen, T. S., Hanna, J., Zhang, X., Ku, M., Wernig, M., Schorderet, P., Bernstein, B. E., Jaenisch, R., Lander, E. S., Meissner, A. (2008) Dissecting Direct Reprogramming through Integrative Genomic Analysis. *Nature*, 454: 49-55.

Miyoshi, N., Ishii, H., Nagano, H., Haraguchi, N., Dewi, D. L., Kano, Y., Nishikawa, S., Tanemura, M., Mimori, K., Tanaka, F., Saito, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikeda, M., Yamamoto, H., Sekimoto, M., Doki, Y., Mori, M. (2011) Reprogramming of Mouse and Human Cells to Pluripotency Using Mature MicroRNAs. *Cell Stem Cell*, 8(6): 633-638.

- Nakagawa, M., Koyanagi, M., Tanabe, K., Takahashi, K., Ichisaka, T., Aoi, T., Okita, K., Mochiduki, Y., Takizawa, N., Yamanaka, S. (2008) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Without Myc from Mouse and Human Fibroblasts. *Nature Biotechnology*, 26(1): 101-106.
- Newman, A. M., Cooper, J. B. (2010) Lab-Specific Gene Expression Signatures in Pluripotent Stem Cells. *Cell Stem Cell*, 7(2): 258-262.
- Okita, K., Ichisaka, T., Yamanaka, S. (2007) Generation of Germline-Competent Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature*, 448: 313-315.
- Park, I-H, Arora, N., Huo, H., Maherali, N., Ahfeldt, T., Shimamura, A., Lensch, M. W., Cowan, C., Hochedlinger, K., Daley, G. Q. (2008) Disease-Specific Induced Pluripotent Stem Cells. *Cell*, 134: 877-886.
- Plath, K., Hochedlinger, K. (2009) Epigenetic Reprogramming and Induced Pluripotency. *Development*, 136(4): 509-523.
- Regan, T. (1983). *The Case for Animal Rights*. Berkely & Los Angeles (CA): University of California Press.
- Stadtfeld, M., Apostolou, E., Akutsu, H. (2010) Aberrant Silencing of Imprinted Genes on Chromosome 12qF1 in Mouse Induced Pluripotent Stem Cells. *Nature*, 465(7295): 175-181.
- Stadtfeld, M., Maherali, N., Breault, D. T., Hochedlinger, K. (2008) Defining Molecular Cornerstones during Fibroblast to iPS Cell Reprogramming in Mouse. *Cell Stem Cell*, 2: 230-240.
- Stadtfeld, M., Nagaya, M., Utikal, J., Weir, G., Hochedlinger, K. (2008) Induced Pluripotent Stem Cells Without Viral Integration. *Nature*, 332: 945-949.
- Stadtfeld, M., Hochedlinger, K. (2010) Induced Pluripotency: History, Mechanisms, and Applications. *Genes and Development*, 24: 2239-2263.

- Takahashi, K., Yamanaka, S. (2006) Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell*, 126: 663-676.
- Takahashi, K., Tanabe, K., Ohnuki, M., Narita, M., Ichisaka, T., Tomoda, K., Yamanaka, S. (2007) Induction of Pluripotent Stem Cells from Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*, 131: 861-872.
- Utikal, J., Hochedlinger, K., Maherali, N., Kulalert, W. (2009) Sox2 is Dispensable for the Reprogramming of Melanocytes and Melanoma Cells into Induced Pluripotent Stem Cells, *Journal of Cellular Science*, 112(19): 3502-3510.
- Wernig, M., Meissner, A., Cassady, J. P., Jaenisch, R. (2008) c-Myc is Dispensable for Direct Reprogramming of Mouse Fibroblasts. *Cell Stem Cell*, 2: 10-12.
- Wilmut, I., Schnieke, A. E., McWhir, J., Kind, A. J., Campbell, K. H. S. (1997) Viable Offspring Derived from Fetal and Adult Mammalian Cells. *Nature*, 385: 810-813.
- Xie, H., Ye, M., Feng, R., Graf, T. (2004) Stepwise Reprogramming of B Cells into Macrophages. *Cell*, 117: 663-676.
- Yamanaka, S. (2006) A Fresh Look at iPS Cells. *Cell*, 3: 13-17.
- Zhou, H., Wu, S., Joo, J. Y., Zhu, S., Han, D. W., Lin, T., Trauger, S., Bien, G., Yao, S., Zhu, Y., Siuzdak, G., Scholer, H. R., Duan, L., Ding, S. (2009) Generation of Induced Pluripotent Stem Cells Using Recombinant Proteins. *Cell Stem Cell*, 4: 381-384.