

oocytter – dvs. hvad man forstår ved nukleær kloning. Disse oocytter blev efterfølgende ekspanderet *in vitro* til blastocyststadiet, hvorpå de blev anvendt til at derivere ES-celler. Den genetiske mutation i Rag2 blev efterfølgende rettet vha. homolog rekombination, og de resulterende ES-kloner (nu med et funktionelt Rag2gen) blev differentieret til såkaldte *embryoid bodies*, hvilket er en klump celler, som deler en lang række egenskaber med et tidligt embryo. Disse *embryoid bodies* blev efterfølgende transduceret med et gen (HoxB4), hvis produkt for nylig er blevet brugt til voldsomt at forøge repopulationspotentialet af hæmatopoetiske stamceller (HSC), og differentieret *in vitro* til HSC-lignende celler. Da disse celler blev transplanteret ind i en Rag2-mutant mus, gav de ophav til både modne B- og T-celle-lymfocytter, dog i relativt beskedne mængder. Denne teknologiske kraftpræstation leverer et formelt bevis for konceptet om terapeutisk kloning. Det er altså nu i praksis muligt at kurere en patient (foreløbig dog kun mus), med dens eget cellemateriale. Om man så vælger at gå denne vej kræver naturligvis grundige etiske og økonomiske overvejelser.

Vi har i denne artikel kort beskrevet nogle få systemer, hvor mus har tjent som nyttige eksperimentelle modeller til studiet af humane sygdomstilstande.

Sekvensbestemmelsen af det humane genom, den stadig stigende korrelation mellem genotype og fænotype for et hav af maligne tilstande samt muligheden for præcist at kunne skræddersy mus med de ønskede genetiske forandringer, vil i fremtiden kun øge anvendelsen af mus som en eksperimentel sygdomsmodel.

Summary

Mikkel Bruhn Schuster & Bo Torben Porse: Transgenic mice as disease models.

Ugeskr Læger 2003;165:793-6.

Transgenic animal models have proven to be useful tools in understanding both basic biology and the events associated

with disease. Recent technical advances in the area of genomic manipulation in combination with the availability of the human and murine genomic sequences now allow the precise tailoring of the mouse genome. In this review we describe a few systems in which transgenic animal models have been employed for the purpose of studying the etiology of human diseases.

Reprints: Bo Porse, Laboratorium for Genterapiforskning, H:S Rigshospitalet, DK-2100 København Ø. E-mail: porse@rh.dk

Antaget den 15. januar 2003.

H:S Rigshospitalet, Laboratorium for Genterapiforskning.

Litteratur

1. Orlic D, Kajstura J, Chimenti S et al. Bone marrow cells regenerate infarcted myocardium. *Nature* 2001;410:701-5.
2. Blau HM, Brazelton TR, Weimann JM. The evolving concept of a stem cell: entity or function. *Cell* 2001;105:829-41.
3. Druker BJ. STI571 (Gleevec) as a paradigm for cancer therapy. *Trends Mol Med* 2002;8:S14-8.
4. Capdeville R, Buchdunger E, Zimmermann J et al. Glivec (STI571, imatinib), a rationally developed, targeted anticancer drug. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1:493-502.
5. Huettner CS, Zhang P, van Etten RA et al. Reversibility of acute B-cell leukaemia induced by BCR-ABL1. *Nature Genetics* 2000;24:57-60.
6. Kelly LM, Kutok JL, Williams IR et al. PML/RARalpha and FLT3-ITD induce an APL-like disease in a mouse model. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2002;99:8283-8.
7. Kelly LM, Yu JC, Boulton CL et al. CT53518, a novel selective FLT3 antagonist for the treatment of acute myelogenous leukemia (AML). *Cancer Cell* 2002;1:421-32.
8. Weisberg E, Boulton C, Kelly LM et al. Inhibition of mutant FLT3 receptors in leukemia cells by the small molecule tyrosine kinase inhibitor PKC412. *Cancer Cell* 2002;1:433-43.
9. Rideout III WM, Hochedlinger K, Kyba M et al. Correction of a genetic defect by nuclear transplantation and combined cell and gene therapy. *Cell* 2002;109:17-27.

Molekylærbiologisk fokus på stamcelleforskningen

STATUSARTIKEL

Peter Ebbesen

Stamceller defineres som celler, der kan 1) reproducere sig selv og 2) differentiere til mange celletyper. Begge processer må naturligvis være strengt regulerede for at sikre organismens overlevelse. Det er først inden for de seneste år, at stamcellerne er blevet »taget under behandling« af molekylærbiologerne. Årsagen er den simple, at man har haft svært ved at isolere stamcellerne. Deres fænotype var ofte ukendt, og de forekommer oftest som en endog meget lille minoritet blandt de andre celletyper i vævene.

Der er nu kendskab til en række markører for både embryonale (1) og adulte stamceller og andre udifferentierede celler, således at de kan frasorteres ved en cellesuspension, f.eks. ved at lade dem fange af antistoffer, der selv er forankret til et fast underlag. Det er endog med konfokal laserdissektion muligt at »fiske« enkeltceller ud af et væv.

Stamcellernes molekylære processer er nu under hastig udredning

En stamcelles molekylære fænotype kan bestemmes med *array*-hybridiseringsteknikken, hvor et meget stort antal geners aktivitet på et givet tidspunkt kan aflæses. Dette sker ved at påvise tilstedeværelse i cellerne af de specifikke med-

delers-RNA'er (mRNA) gennem deres binding til chips, som bærer et meget stort antal molekyler, der hver for sig kun kan hybridisere til et bestemt mRNA. I dag findes der sådan information i databaser (2).

Ved at teste mRNA-ekspressionsmønstret i stamceller og derefter i de mere differentierede celler, der opstår in vitro under indflydelse af tilsatte differentieringsfaktorer, får man et første indtryk af de processer, der fastholder en stamcelle i dens udifferentierede form og under andre betingelser styrer differentiationen fra stamcelle til en specialiseret celletype (3).

I kroppen er flertallet af stamceller anbragt i specielle mikromiljøer, såkaldte stamcellenicher. Eksempler herpå er for epitele stamcellers vedkommende hårfollikler, for endodermale celler er det tarmkrypter og for hæmatopoietiske stamceller er det den perifere del af marvshulen. Disse miljøer kan naturligvis ikke genskabes uden for kroppen, men molekylærbiologien kan udrede, hvilke påvirkninger og genaktiviteter der er de afgørende for, at man in vitro kan styre stamcellernes replikation og differentiation.

Man ved i dag, at et lille antal gener skal eksprimeres, for at udifferentierede mesodermale celler kan udvikle sig til hæmatopoietiske stamceller, og man kender en regulator, der lader til at være den, der holder stamceller uden for celledyklus, når der ikke er brug for opformering.

Det synes generelt at være sådan, at kun et lille antal gener skal aktiveres for at sikre differentiering af stamceller i en bestemt retning. Samtidig sikres valget af en bestemt differentieringsretning ved hæmning af et langt større antal gener, hvis aktivering kunne lede cellen i retning af andre modne celletyper.

Stamcellerne forventes i fremtiden at få bred anvendelse som en afgørende del af regenerativ medicin

Anvendelsen vil ske på tre principielt forskellige måder:

1) Man vil bruge cellesuspensioner som substitutionsterapi, hvor stamceller tilføres et væv eller intravenøst til hele organismen. Denne påtvinger så stamcellerne en differentiering, hvor vævet behøver nye højt differentierede celler i lighed med den gammelkendte procedure, hvor hæmatologiske stamceller tilføres intravenøst ved knoglemarvstransplantationerne. Der er en række kliniske eksperimenter i gang, hvor man tilfører stamceller for at hjælpe helingen, f.eks. efter koronarokklusioner. Denne terapiform forudsætter naturligvis, at mikromiljøet i vævene er i stand til at producere de differentieringsfaktorer, der skal til for at udvikle de tilførte stamceller til specialiserede celler. Processen kan naturligvis hjælpes udefra med f.eks. cytokiner. Alene af den grund er der et behov for at kende de molekylære processer, der skal påvirkes for at uddifferentiere stamceller til de ønskede slutprodukter. En variant heraf vil forekomme, hvor antallet af stamceller, der er til rådighed, ikke er klinisk tilstrækkeligt. Man skal derfor først øge antallet ved dyrkning i vævskultur, hvilket allerede i en række tilfælde er gjort med hæmatopoietiske stamceller (4). Ved en sådan opformering er opgaven at sikre cellerne et in vitro-miljø, der hindrer en differentiering, og det kan vise sig at være et

større problem for molekylærbiologien end at sikre differentiering. Faktisk er de ydre påvirkninger med signalmolekyler, der skal til for at tillade stamcellers deling uden samtidig differentiering, næsten ukendte og betragtes i dag som en af hovedudfordringerne for molekylærbiologisk forskning i stamceller.

2) En anden terapimodel bliver in vitro-differentiering af stamceller til den ønskede celletype med påfølgende transplantation af de differentierede celler til syge organer, der ikke selv formår at dirigere stamceller til de nødvendige slutceller. Denne situation forventes at komme til at foreligge ved f.eks. diabetes og nogle degenerative nervedilser. Ved type 1-diabetes destrueres patientens betaceller som bekendt af autoimmune processer. Dette kunne evt. omgås, ved at betaceller, der er dannet i vævskultur inden transplantationen, indkapsles, således at immunceller ikke kan destruere dem.

3) En helt tredje terapeutisk anvendelse af stamceller vil finde sted i bioteknologien, hvor man uden for kroppen vil dyrke organdele, som kroppen ikke kan regenerere in vivo. På grund af det astronomiske antal haplotyper af vævstypemolekyler er der ringe sandsynlighed for at finde det perfekte match mellem fremmed donor (f.eks. embryonale stamceller fra et befrugtet æg) og en recipient ved allo (fremmed)-transplantationer. Der vil derfor altid være en vis afstødningsreaktion. Det skal dog fremhæves, at netop embryonale stamceller synes at give større accept af vævstypuforlidelighed. Dannelse af erstatningsvæv ud fra egne (autologe) stamceller vil dog ofte være at foretrække. Dette kan i nogle tilfælde gøres relativt simpelt. Ny brusk kræver, at stamceller formeres i vævskultur og derefter påvirkes til at differentiere til modne bruskceller. Endelig skal de vokse i flere lag. Dette sidste tilsyneladende enkle krav er der i dag ingen god løsning på. De molekylærbiologiske mekanismer, der skal påvirkes, er ikke udredt.

Hertil kommer anvendelsen af stamceller til generapi (5). Hvis der tilføres nye gener til celler, der er i differentiering, vil generne efter en tid tabes for kroppen sammen med cellernes slutdifferentiation og senere død. I modsætning hertil vil stamceller, der har fået tilført nye gener, opbevare dem for patienten i hele vedkommendes levetid. Generne reproduceres jo i forbindelse med stamcellernes deling og vil derfor til stadighed blive tilført de nye modne celler, der udvikles fra stamcellepoolen.

Stamceller til klinisk anvendelse vil blive hentet fra flere forskellige kilder

Stamcellelinjer kan etableres fra kimskenen i befrugtede æg (embryonale stamceller), fra ubefrugtede æg, hvor æggets haploide kerne er udskiftet med (befrugtet med) en diploid cellekerne fra en voksen celle i den patient, der skal modtage transplantatet (terapeutisk kloning), føtale stamceller skaffet fra aborterede fostre eller fra navlesnorsblodet, og endelig kan adulte stamceller høstes fra børn og voksne.

Generelt er stamcellers mulighed for at differentiere til forskellige celletyper (plasticiteten) og deres delingspotentiale mindre, jo senere i livet cellerne høstes. Molekylærbiologisk forskning har vist, at der i normale differentierede

celler ved hver celledeling sker en fremadskridende demetylering af generne (6), og cellen mister samtidig noget af det RNA-enzym, telomerase, som syntetiserer telomerisk DNA, der sidder som endestykker på kromosomerne (7). Disse to processer fører til sidst til, at cellerne ikke længere kan dele sig. En af de forandringer, som finder sted, når en celle bliver malign, er, at de omtalte celleforandringer fastfryses, således at kræftcellen får ubegrænset delingspotentiale. Det samme gælder den embryonale stamcelle, der under de rette betingelser fastholder sin telomeraseaktivitet og slipper for begrænsning i delingspotentialet (8). Dette taler naturligvis for at anvende embryonale stamceller som byggestenene i den regenerative medicin. Det har dog været fremført, at anvendelse af embryonale celler kunne indebære en vis risiko for kræftudvikling, da embryonale musestamceller efter transplantation til voksne mus kan fremkalde teratokarcinomer (9). I hvert fald synes stamceller, der er etableret efter kernetransplantation med den nuværende teknik, at indebære en særlig risiko for at fremkalde genetiske fejl (10). Denne risiko synes ikke at foreligge ved f.eks. ekspansion af de ikkeembryonale stamceller fra f.eks. navlesnorsblod (4).

Den igangværende molekylærbiologiske forskning vil kortlægge de processer, der kan påvirkes i terapeutisk øjemed uden for og i kroppen og formentlig muliggøre, at stamceller af forskellig oprindelse kan bruges som byggesten i den regenerative medicin. Man vil dog nok, for at mindske risikoen for at transplantere celler med uønskede egenskaber, skele til nærhedsprincippet og foretrække at bruge de stamceller, der er mest genomisk stabile, og som skal underkastes færrest manipulationer og celledelinger, inden de indføres i kroppen.

Summary

Peter Ebbesen:

Molecular biological focus on stem cell research.

Ugeskr Læger 2003;165:796-8.

Stem cells are defined by their capacity to reproduce themselves and to differentiate into many other cell types. Differentiation requires external signals and involves activation of a small number of genes. Which source of stem cell will eventually be used in the clinic has not yet been determined. Embryonic stem cells have unlimited in vitro division capacity and can differentiate to all cell types, but there may be a problem with genomic instability. Stem cells from cord blood and adult tissue seem to have limited in vitro division and differentiation potential, but stable genomes.

Reprints: *Peter Ebbesen*, Laboratoriet for Stamcelleforskning, Aalborg Universitet, Gustav Wiedes Vej 10B, DK-8000 Århus C.

Antaget den 14. januar 2003.

Aalborg Universitet, Laboratoriet for Stamcelleforskning.

Litteratur

1. Lebkowski JS, Gold J, Xu C et al. Human embryonic stem cells: culture, differentiation, and genetic modification for regenerative medicine applications. *Cancer J* 2001;7(suppl 2):S83-93.

2. Phillips RL, Ernst RE, Brunk B et al. The genetic program of hematopoietic stem cells. *Science* 2000;288:1635-40.
3. Loring JF, Porter JG, Seilhammer J et al. A gene expression profile of embryonic stem cells and embryonic stem cell-derived neurons. *Restor Neurol Neurosci* 2001;18:81-8.
4. Katayama Y, Miyamoto K, Takenaka K et al. Chromosome analysis after ex vivo expansion of CD34(+) cells from human cord blood. *Cancer Genet Cytogenet* 2001;125:161-2.
5. Luther-Wyrsch A, Costello E, Thali M et al. Stable transduction with lentiviral vectors and amplification of immature hematopoietic progenitors from cord blood of preterm human fetuses. *Hum Gene Ther* 2001;12:377-89.
6. Holliday R. Senescence of dividing somatic cells. I: Marshak DR, Gardner RL, Gottlieb D, eds. *Stem cell biology*. New York: Cold Spring Harbour Laboratory Press, 2001:95-109.
7. Drissi R, Zindy F, Roussel MF et al. c-Myc-mediated regulation of telomerase activity is disabled in immortalized cells. *J Biol Chem* 2001;276:29994-30001.
8. Niida H, Matsumoto T, Satoh H et al. Severe growth defect in mouse cells lacking the telomerase RNA component. *Nat Genet* 1998;19:203-6.
9. Folketingets høring om stamceller 22. november 2000. København: It- og Forskningsministeriet, 2002.
10. Humpherys D, Eggan K, Akutsu H et al. Epigenetic instability in ES cells and cloned mice. *Science* 2001;293:95-7.