

VORMING VAN HEMATOPOËTISCHE STAMCELLEN UIT PLURIPOTENTE STAMCELLEN: STAND VAN ZAKEN.

Ella Staelens

Stamnummer: 01303710

Promotor: Prof. dr. Tom Taghon

Masterproef voorgelegd in het kader tot het behalen van de graad Master of Medicine in de Geneeskunde

Academiejaar: 2017 - 2018



“De auteur en de promotor geven de toelating dit afstudeerwerk voor consultatie beschikbaar te stellen en delen ervan te kopiëren voor persoonlijk gebruik. Elk ander gebruik valt onder de beperkingen van het auteursrecht, in het bijzonder met betrekking tot de verplichting uitdrukkelijk de bron te vermelden bij het aanhalen van resultaten uit dit afstudeerwerk.”

Datum

(handtekening)

Naam (student)

(promotor)

VOORWOORD

Via deze weg wil ik graag een aantal mensen bedanken. Zonder hen zou deze masterproef niet tot stand gekomen zijn.

In eerste instantie bedank ik graag mijn promotor, Prof. Dr. Tom Taghon, voor het geduld en de ondersteuning bij het schrijven van dit werk. Ik kon steeds rekenen op zijn begrip en kon altijd bij hem terecht voor grondige feedback en hulp.

Verder wil ik graag mijn familie en vrienden bedanken voor de morele steun tijdens dit proces en voor het tolereren van mijn frustraties die nu en dan al eens de bovenhand namen. Ook bedank ik graag mijn ploeggenoten voor de nodige ontspanning met trainingen en wedstrijden tussendoor.

Een speciale vermelding gaat nog uit naar Liesbeth Deroose, voor de onuitputbare steun en motivatie.

AFKORTINGEN

AGM	Aorta-gonadale mesonefros
A/N	Activin/Nodal pathway
bFGF	Beta fibroblast growth factor
BM	Beenmerg
CFC	Colony forming cell
CLP	Gemeenschappelijke lymfoïd progenitor
CMP	Gemeenschappelijke myeloïd progenitor
EB	Embryoïd body
EC	Endotheliale cel
ECC	Embryonale carcinoma cel
EHT	Endothelial to hematopoietic cell transition
EMP	Erythroïd-myeloïd progenitor
ESC	Embryonale stamcel
mESC	Murine embryonale stamcel
hESC	Humane embryonale stamcel
Fib	Fibroblast
FL	Foetale lever
GlyA	Glycophorine A
GMP	Granulocyt-macrofaag progenitor
Hb	Hemoglobine
HC	Hematopoëtische cel
HE	Hemogeen endotheel
HP	Hematopoëtische progenitor
HSC	Hematopoëtische stamcel
LT-HSC	Lange termijn HSC
ST-HSC	korte termijn HSC
HSCT	Hematopoëtische stamcel transplantatie
HSPC	Hematopoëtische stam- en progenitorcel
ICM	Inner cell mass

iPSC	Induced pluripotent stamcel
miPSC	Murien induced pluripotent stamcel
hiPSC	Humaan induced pluripotent stamcel
LIF	Leukemie iniberende factor
MEF	Muis embryonale fibroblast
MEP	Megakaryocyt-erythroïd progenitor
MPP	Multipotente progenitor
MSC	Mesenchymale stamcel
MK	Megakaryocyt
NK	Natural killer
PSC	Pluripotente stamcellen
SCF	Stamcelfactor
TF	Transcriptiefactor
TNC	Totaal genucleëerde cellen
WNT/B	Wnt/beta-catenine pathway
YS	Dooierzak

INHOUDSOPGAVE

1. ABSTRACT	1
2. INLEIDING	2
2.1. stamcellen	2
2.2. Hematopoëse	6
2.3. Bloeddonatie	9
2.4. Hematopoëtische stamceltransplantatie	10
3. VRAAGSTELLING	12
4. METHODOLOGIE	12
5. RESULTATEN	13
5.1. Algemeen gebruikt protocol	13
5.1.1. Differentiatie van de PSCs	13
5.1.2. Identificatie van HSCs	14
5.2. Gebruik van een gedefinieerd protocol	18
5.3. Invloed van de micro-omgeving	20
5.3.1. Gebruik van hematopoëtische niches	20
5.3.2. Transplantatiemodel	24
5.4. Invloed van de gebruikte PSCs	25
5.4.1. ESC lijnen	25
5.4.2. iPSCs	26
5.5. Overexpressie of silencing van genen die een rol spelen in de hematopoëse	28
5.5.1. HOXB4	28
5.5.2. Lhx2	32
5.5.3. HOXA9	33
5.5.4. RUNX1	35
5.6. Manipulatie van pathways	37
5.7. Gebruik van kleine moleculen	39
5.7.1. Retinoïnezuur	39
5.7.2. Adenosine	40
5.8. In vivo generatie van HSCs Via teratoma-vorming	42
5.9. Directe conversie	43
6. DISCUSSIE	45
7. BESLUIT	48
8. REFERENTIES	49

1. ABSTRACT

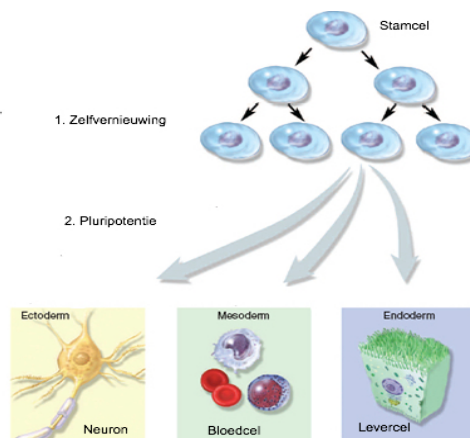
In deze masterproef wordt, aan de hand van een literatuurstudie, een overzicht aangeboden van de uitdagingen en de vooruitgang die reeds geboekt werd bij de vorming van hematopoëtische stamcellen (HSC) uit pluripotente stamcellen (PSC), die zowel embryonale stamcellen (ESC) als geïnduceerde pluripotente stamcellen (iPSC) omvatten. Omwille van de verschillende beperkingen bij de isolatie van HSCs voor HSC-transplantatie (HSCT), kan de in vitro generatie van HSCs uit PSCs hiervoor een alternatief bieden.

Door gebruik te maken van delen uit hematopoëtische niches die een belangrijke rol spelen tijdens de embryonale hematopoëtische ontwikkeling, slaagde men erin de differentiatie van PSCs richting het hematopoëtische programma te sturen. Ook de overexpressie van genen betrokken in de normale hematopoëtische ontwikkeling zoals HOXB4, Lhx2, HOXA9 en RUNX1 zorgde voor een sterkere hematopoëtische inductie van PSCs. De keuze van het type PSC bleek eveneens een rol te spelen in de efficiëntie van generatie en dit was vooral voor iPSCs van belang. Verdere manipulatie van de differentiatie van PSCs naar de hematopoëtische lijn kon men creëren door inhibitie of activatie van bepaalde kleine moleculen, zoals retinoïnezuur en adenosine, en de Activin/Nodal en Wnt/beta-catenine pathway. Vorming van transplantabele HSCs via in vivo teratoma vorming of via directe conversie van somatische celtypes, bleken eveneens belovende resultaten te geven. Tijdens al deze experimenten werden echter vooral cellen uit de primitieve golf gevormd, die voornamelijk een myeloïde bias vertoonden. Bovendien lag de efficiëntie van generatie vrij laag. Verder onderzoek is dus aangewezen vooraleer deze methode naar de therapeutische wereld kan vertaald worden.

2. INLEIDING

2.1. STAMCELLEN

Het menselijk lichaam bestaat uit ongeveer 100.000 miljard cellen, die kunnen onderverdeeld worden in circa 250 verschillende soorten. Elke soort cel heeft andere eigenschappen omdat ze op een verschillende plaats in het lichaam werken. Zo zal de voornaamste functie van een huidcel verschillen van die van een cel in de lever. Al deze verschillende gespecialiseerde, of gedifferentieerde, cellen ontstaan echter uit een en dezelfde cel, de embryonale stamcel (ESC) (1). Deze cel is heel vroeg in de ontwikkeling van het embryo terug te vinden en verschilt op 2 manieren van bovengenoemde gespecialiseerde cellen. Enerzijds is dit celtype in staat tot zelfvernieuwing, wat betekent dat de dochtercel na elke celdeling exact dezelfde eigenschappen heeft als de moedercel. Waar een gespecialiseerde cel na een bepaald aantal delingen sterft en vervangen wordt, zal de stamcel een onsterfelijk fenotype hebben en op die manier zeer bruikbaar zijn voor onderzoek en therapie. Anderzijds is de stamcel pluripotent. Dankzij deze eigenschap kan de stamcel differentiëren in elk gespecialiseerd celtype. Meer bepaald elke soort cel die ontstaat uit de drie kiemlagen: endoderm, mesoderm en ectoderm. Zelfvernieuwing en pluripotentie zijn de 2 essentiële kenmerken van de stamcel (2).

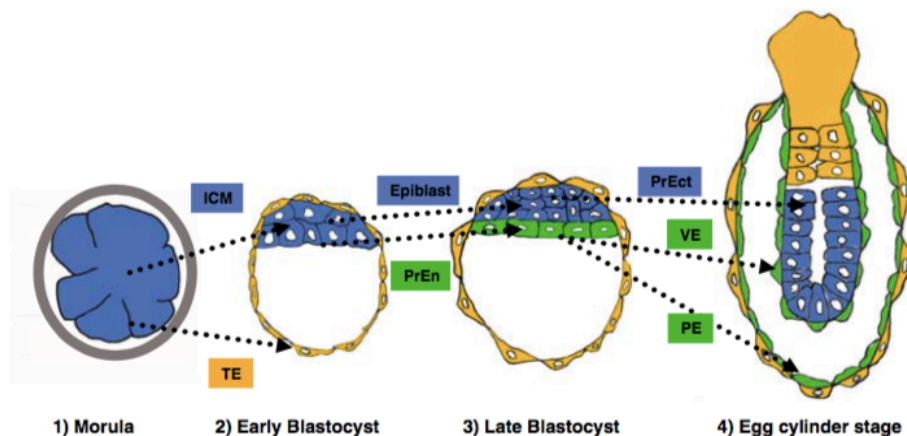


Figuur 1. Schematische voorstelling van de essentiële kenmerken van de embryonale stamcel (3).

Het onderzoek van de pluripotente stamcellen begon in de jaren '50 met de studie van de teratocarcinoma's, een maligne tumor die teruggevonden werd in de testes van muizen. Deze tumoren ontstaan uit de voorlopers van spermacellen. Ze bestaan voor een deel uit gedifferentieerde cellen die normaal niet in de testes gevonden worden en bijgevolg dus afkomstig zijn van de drie kiemlagen. Anderzijds werden ook niet-gedifferentieerde cellen gevonden, die de naam embryonale carcinoma cellen (ECC) kregen (1, 4). Wanneer ECCs werden getransplanteerd in andere muizen, ontstonden opnieuw teratocarcinoma's, die zowel gedifferentieerde als niet-gedifferentieerde cellen bevatten. Dit leverde het bewijs voor zelfvernieuwing en pluripotentie (4). Echter, wanneer de ECCs werden geïnjecteerd in

blastocyten, gaven deze geen aanleiding tot normaal weefsel. Meer specifiek werd geen differentiatie in mannelijke of vrouwelijke geslachtscellen gevonden. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het ontstaan van mutaties in de ECCs tijdens de vorming en groei van de teratocarcinoma's. Daarom kunnen dit soort cellen niet gebruikt worden om experimenteel geïnduceerde mutaties door te geven aan het nageslacht, wat een belangrijk doel is van het stamcelonderzoek. Om deze reden werd op zoek gegaan naar een andere bron van stamcellen (1, 4).

Theoretisch gezien kunnen stamcellen op verschillende niveaus van de embryonale ontwikkeling teruggevonden worden. Het proces begint met de bevruchting van de eicel of oöcyt. Deze cel begint te delen en bereikt een 32-cellig stadium, de 'morula'. Tot aan dit stadium zijn alle cellen nog totipotent, wat betekent dat ze zowel aanleiding kunnen geven tot cellen van de drie kiemlagen als extra-embryonaal weefsel. De 'blastocyst' bevat 2 verschillende celtypes. Een buitenste laag, het trophoctoderm (TE), zal na implantatie het foetale deel van de placenta vormen. Binnenin vinden we een groepje cellen terug die de naam 'inner cell mass' (ICM) krijgt. Een deel van deze cellen zullen evolueren naar primitief endoderm (PrEn), dat later aanleiding zal geven tot de vruchtzak, allantoïs en het amnion. Hierna vindt de implantatie plaats en zullen de cellen van de ICM een epitheliale laag vormen, de 'epiblast'. Deze epiblast zal uiteindelijk, na gastrulatie, aanleiding geven tot de 3 kiemlagen en zo tot alle cellen van ons lichaam (2, 5).



Figuur 2. Ontwikkeling van het embryo bij de muis. 1) Morula 2) blastocyst met het trophoctoderm (TE) en de inner cell mass (ICM) 3) Een deel van de ICM ontwikkelt zich tot primitief endoderm (PrEn). Het overblijvende deel is de epiblast. 4) Bij de muis zal na implantatie een cilindervormig stadium bestaan, waarin gastrulatie gebeurt. Afkortingen: primitief ectoderm (PrEct), visceraal endoderm (VE) en pariëtaal endoderm (PE) (2).

In 1981 slaagde men erin stamcellen te isoleren uit de ICM van muizen embryo's in het blastocyst-stadium door gebruik te maken van dezelfde kweekcondities als bij ECCs (1, 4). Dit zorgde voor een belangrijke doorbraak omdat deze muriene embryonale stamcellen (mESC), in tegenstelling tot ECCs, wel aanleiding gaven tot geslachtscellen wanneer ze getransplanteerd werden in een andere blastocyst. Als een mESC genetisch gemodificeerd en getransplanteerd wordt, ontstaat een situatie waarbij een deel van de cellen van het dier de mutatie bevatten en het andere deel van de cellen niet. Indien de mutatie zich in de geslachtscellen bevindt, kan deze doorgegeven worden aan het nageslacht. Zo kunnen de functies van specifieke genen en de gevolgen van mutaties in die genen achterhaald worden. Door de ontwikkeling van grootschalige mutatiestrategieën kan praktisch elk gen onderzocht worden en werden zogenaamde mutatie-bibliotheken ontwikkeld. Ook kunnen diermodellen gemaakt worden van ziektes die voorkomen bij de mens, zoals mucoviscidose (1).

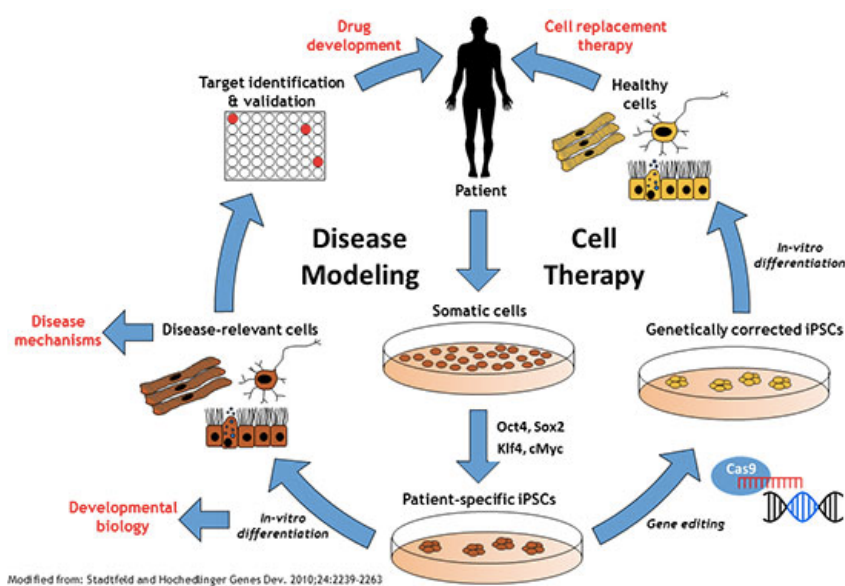
Door de grote vooruitgang die geboekt werd met de ontdekking van de mESC, besloot men de aandacht te verleggen van muis naar mens. Omdat de eigenschappen van embryonale stamcellen tussen soorten erg verschillen en de kweekcondities voor menselijke ESCs (hESC) niet optimaal waren, duurde het tot 1998 vooraleer de eerste hESCs geïsoleerd konden worden (1, 4). Hoewel zowel hESC als mESC de twee essentiële eigenschappen van stamcellen hebben, zijn zij niet volledig gelijk (1). Morfologisch zien we bijvoorbeeld dat mESC groeien in een drie dimensionele structuur, terwijl hESC eerder groeien in dunne lagen, vaak zelfs éénlagig. Daarnaast zien we ook dat de signalen nodig voor het behoud van zelfvernieuwing verschillen (2). Omwille van ethische bezwaren kunnen hESCs echter niet steeds gebruikt worden (1).

De ontdekking van de induced pluripotent stem cells (iPSC) in 2006 leidde tot een zeer grote doorbraak in het stamcelonderzoek. In de dierlijke embryogenese wordt de differentiatie van cellen voornamelijk gecontroleerd door epigenetische, eerder dan genetische, veranderingen. Door op die veranderingen in te spelen, is de differentiatie in theorie dus omkeerbaar (6). Door het klonen van schaap Dolly werd aangetoond dat bepaalde factoren die zich in de eicel bevinden, in staat zijn om een gedifferentieerde cel terug naar zijn ongedifferentieerde toestand te brengen. Deze reprogrammatie aan de hand van de zogenoemde *somatic cell nuclear transfer* (SCNT) opende de deur voor onderzoek naar andere methoden van reprogrammatie (4, 6). Dankzij het stamcelonderzoek werden verschillende essentiële genen geïdentificeerd die van belang zijn voor het behoud van pluripotentie (5). Dat zijn voornamelijk transcriptiefactoren die constant zorgen voor de expressie en onderdrukking van genen die instaan voor de promotie van pluripotentie respectievelijk differentiatie (2, 5). De groep van Yamanaka bracht vier van deze pluripotentiefactoren (OCT3/4, SOX2, KLF4 en C-MYC) in

overexpressie in fibroblasten van muizen aan de hand van retrovirale transductie. Men bekam een nieuwe soort cel, de murine iPSC (miPSC), die veel gelijkenissen vertoonde met de mESCs. Ze hebben onder andere de essentiële stamceleigenschappen en steunen op dezelfde mechanismen om die eigenschappen te behouden, maar gelijken ook qua morfologie, genexpressie en proliferatie op elkaar (5, 7). Deze ontdekking werd met succes door getrokken naar de mens. Met dezelfde combinatie van factoren, werd niet veel later een menselijke huidcel gereprogrammeerd naar een humane iPSC (hiPSC). Opnieuw waren deze cellen heel gelijkaardig aan hESC (4, 7).

De techniek werd door verschillende onderzoeksgroepen verder verfijnd, waarbij onder andere op zoek werd gegaan naar een alternatief voor C-MYC. Er werd namelijk aangetoond dat de continue expressie van deze laatste in hiPSC kon leiden tot celdood en differentiatie en in mESC zelfs kon bijdragen tot tumorformatie (4, 6-9). Hoewel de iPSCs grote overeenkomsten hebben met ESCs, blijken geïnduceerde stamcellen toch nog een epigenetisch geheugen te hebben (8).

Uiteraard opende deze ontdekking heel wat nieuwe perspectieven. Het eerste doel was hun gebruik in de regeneratieve geneeskunde, meer bepaald via *personalized medicine*, waarmee men de barrières van immunorejectie en ethische kwesties zou kunnen overwinnen. Het doel verschoof echter omwille van de complexiteit van deze toepassing. Nu worden iPSCs voornamelijk gebruikt voor het modelleren en onderzoeken van ziekten en het screenen van medicijnen (7-9).



Figuur 3. Mogelijke toepassingen van iPSCs. Ziektemodel: iPSCs kunnen gedifferentieerd worden in het aangetaste celtype, wat mogelijks kan leiden tot nieuwe inzichten of mogelijke medicijnen. Celtherapie: als het defecte gen gekend is, kan men theoretisch gezien na de correctie ervan een autologe genezing aan de patiënt bieden (10).

2.2. HEMATOPOËSE

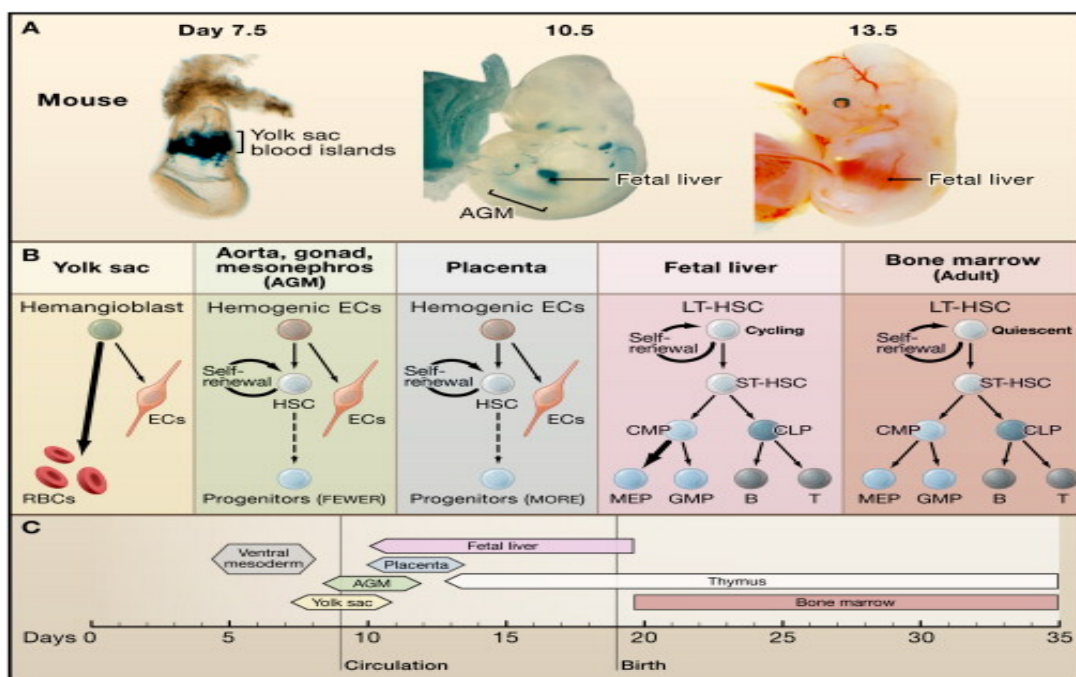
Het doel van de hematopoëse is om een continue productie van bloedcellen te verzekeren via de expansie en differentiatie van progenitorcellen, die op hun beurt ontstaan uit een beperkt aantal multipotente hematopoëtische stamcellen (HSC). HSCs worden éénmalig in het leven gemaakt tijdens de embryonale ontwikkeling en deze is momenteel beter begrepen bij de muis dan de mens (11-13). De muriene hematopoëtische ontwikkeling kan opgesplitst worden in 3 golven die in plaats en tijd gescheiden zijn en strikt gereguleerd worden door de activatie en repressie van bepaalde signaalpaden (14, 15).

Bloedcellen zijn een van de eerste cellen die gevormd worden in de embryonale ontwikkeling en ontstaan nog voor de ontwikkeling van de circulatie (16). Bepaalde mesodermale cellen zijn in staat zich te ontwikkelen tot zowel endotheliale als hematopoëtische cellen en worden hemangioblasten genoemd. Deze cellen migreren naar de dooierzak en vormen daar bloedeilandjes rond E7-7,5. Dit is een opeenhoping van cellen die uiteindelijk omvormen naar een structuur met een buitenste laag cellen die lijkt op endotheelcellen en binnenin de allereerste bloedcellen: primitieve erythroïde progenitorcellen (16-18). Deze produceren grote, gekernde erythrocyten die foetaal hemoglobine (Hb) tot expressie brengen. De voornaamste functie van deze cellen is om het snelgroeiend embryo van zuurstof te voorzien. Ook embryonale macrofagen en megakaryocyten zouden tijdens de eerste golf gevormd worden. Deze macrofagen zullen migreren naar de ontwikkelende weefsels en nog voor de geboorte vervangen worden door volwassen macrofagen in huid, lever en longen. In de hersenen worden deze niet vervangen en blijven de microglia gedurende het hele leven aanwezig (13, 16). De bloedeilandjes versmelten dan om het vasculaire netwerk van het embryo te vormen (13). Naar deze eerste golf van hematopoëse wordt verwezen als 'primitief' omdat hierbij nog geen B- of T-lymfocyten gevormd worden. Van HSCs is op dit moment van de ontwikkeling ook nog geen sprake (14, 17).

De gevormde megakaryocyten en erythrocyten verdwijnen snel op E9 en rond deze periode begint in de dooierzak een tweede golf van hematopoëse (16). Tijdens deze golf worden de meer complexe erythroïd-myeloïd progenitors (EMPs) gevormd uit hemogeen endotheel (HE) in de bloedeilandjes. HE is een gespecialiseerd type endotheelcel dat kan differentiëren in hematopoëtische cellen (11, 14-17). De EMPs ontstaan eerst als clusters in de bloedeilandjes, maar komen dan los en verspreiden zich via de circulatie naar de foetale lever om er rode bloedcellen te vormen die wel volwassen Hb tot expressie brengen en bovendien enucleatie ondergaan (16, 17). Daarnaast worden tijdens deze golf ook macrofagen, granulocyten en monoccyten gevormd. Aangezien in deze golf bovendien B- en T-lymfocyten worden gemaakt, wordt dit als 'definitief' beschouwd. Hierbij ontstaan echter nog geen HSCs maar de gevormde

cellen zouden wel een rol spelen bij de inductie van de derde en laatste hematopoëtische golf (16, 17).

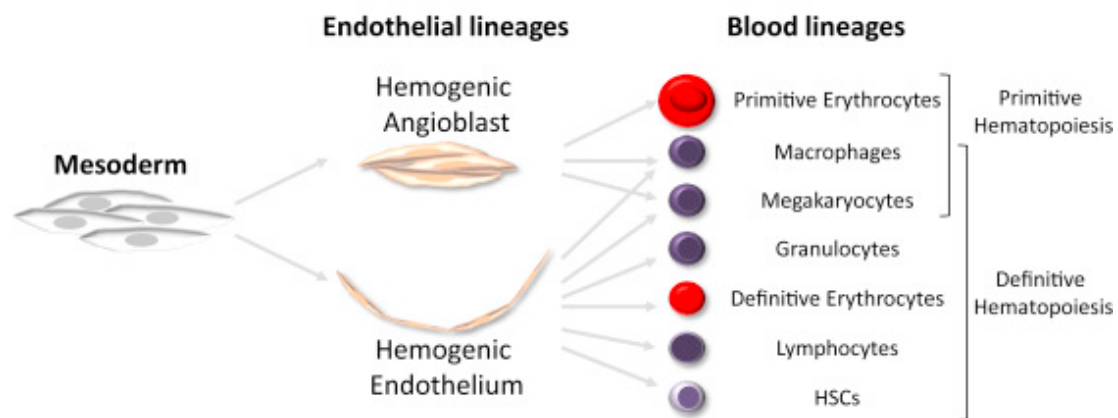
Tijdens de laatste golf van hematopoëse worden dan uiteindelijk HSCs gevormd. Deze ontstaan uit HE in de aorta-gonadale mesonefros (AGM) regio, maar ook in andere bloedvaten, de dooierzak en placenta (17). Het HE wordt teruggevonden op de ventrale wand van de dorsale aorta en deze cellen vormen intra-aortische hematopoëtische clusters, waarin HSCs worden teruggevonden, door een proces dat *endothelial to hematopoietic cell transition* (EHT) wordt genoemd en in alle vertebrale embryo's voorkomt (16). De HSCs verlaten dan de dorsale aorta en verplaatsen zich naar de foetale lever (FL) en placenta om er tijdelijk te prolifereren en uiteindelijk de milt en, kort voor de geboorte, het beenmerg te koloniseren (14). HSCs worden gekenmerkt door het feit dat, na transplantatie in immunodeficiënte (volwassen) ontvangers, zowel gedifferentieerde bloedcellen als nieuwe HSCs teruggevonden kunnen worden (13, 16).



Figuur 4. Overzicht van de embryonale ontwikkeling van hematopoëse. A. Hematopoëse begint in de bloedeilandjes in de dooierzak (YS) en later in de AGM regio, de placenta en foetale lever (FL). B. Afhankelijk van de plaats waar de hematopoëse plaats grijpt, worden specifieke bloedcellen gevormd. C. Tijdlijn met aanduiding van de plaats waar hematopoëse doorgaat. Afkortingen: endotheliale cellen (EC), lange termijn HSC (LT-HSC), korte termijn HSC (ST-HSC), gemeenschappelijke myeloid progenitor (CMP), gemeenschappelijke lymfoid progenitor (CLP), megakaryocyt/erythroid progenitor (MEP), granulocyt/macrofaag progenitor (GMP) (19).

Het is reeds lange tijd aanvaard dat bloedcellen en endotheelcellen in elkaars nabijheid worden gevormd tijdens de embryonale ontwikkeling. Zo is er vastgesteld dat zowel EMPs, B- en T-cellen en HSCs worden gevormd uit HE. De oorsprong van de cellen gevormd tijdens de eerste hematopoëtische golf is echter nog een punt van discussie (15). Zoals reeds hoger

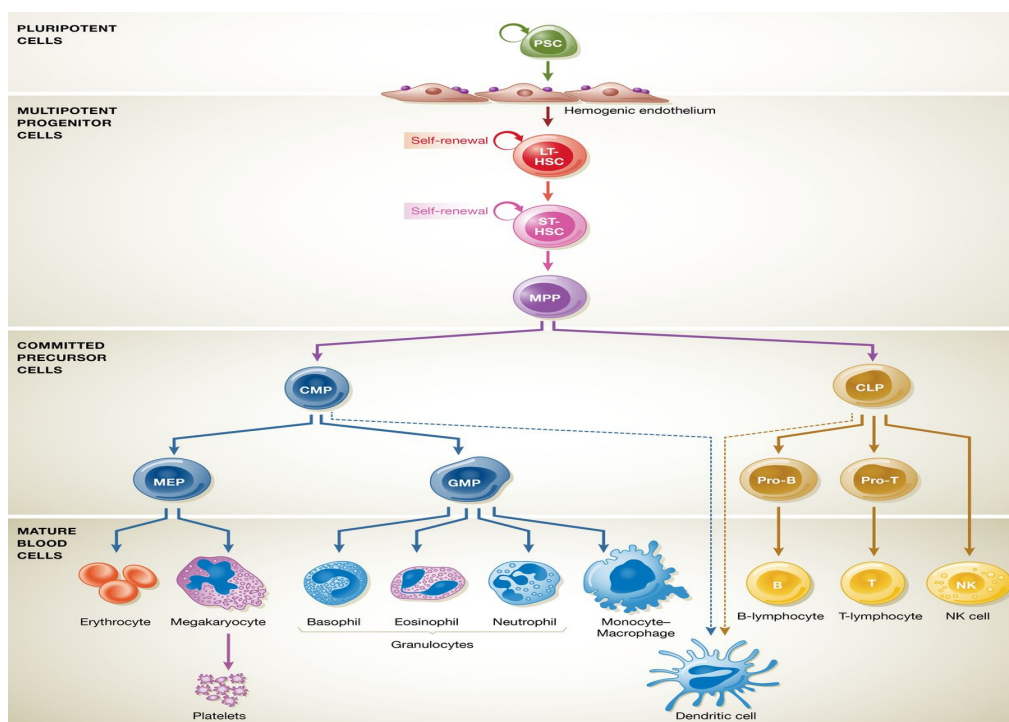
vermeld zouden deze cellen gevormd worden uit een bipotentiële precursor, de hemangioblast. Dit werd reeds in 1932 voor het eerst beschreven door Murray als een verdikking van het mesoderm in een kippenembryo op de plaats waar later de bloedeilandjes gevormd worden. In 1990 werd de bast-colony forming cell geïdentificeerd als een mesodermale precursor voor bloed en endotheel vanuit ESC-differentiatie experimenten. Dit werd beschouwd als de in vitro tegenhanger van de hemangioblast. In tegenstelling tot de hemangioblast, kon deze laatste niet steeds fysiek teruggevonden worden in vivo in de bloedeilandjes maar wel in kleine aantallen in de *primitive streak*. Dit pleitte voor een model waarbij het lot van de cellen reeds bepaald is voor de gastrulatie en de bloedeilandjes in feite gevormd worden uit bloedcellen omringd door endotheelcellen (20, 21).



Figuur 5. Schematisch overzicht van het ontwikkelingspotentieel van de hemangioblast en het HE tijdens de embryonale hematopoëtische ontwikkeling (15).

De hematopoëse wordt gedurende het hele leven onderhouden omdat alle bloedcellen elke 5-120 dagen, afhankelijk van het type bloedcel, vervangen moet worden. De volwassen hematopoëse wordt op dit moment beschouwd als een hiërarchisch proces waarbij alle bloedcellen, van 10 verschillende bloedcellijnen, gevormd worden vanuit een beperkt aantal HSCs in het beenmerg (12-14, 16). Tijdens dit hiërarchisch proces ontwikkelen de bloedcellen zich vanuit intermediaire progenitorcellen die stapsgewijs hun multipotentie en zelfvernieuwingscapaciteit verliezen (16). Bovenaan de pyramide staat de lange termijn HSCs (LT-HSCs) die, na maturatie in de aorta en FL tijdens de embryonale ontwikkeling, het beenmerg koloniseren. Deze ontwikkelen verder naar korte termijn HSCs (ST-HSCs) en multipotente progenitors (MPP), die telkens een lagere repopulatiecapaciteit met een eindige zelfvernieuwingscapaciteit vertonen. Hieruit vormen de voorlopercellen (committed precursor cells) zich, die geen zelfvernieuwing meer kunnen ondergaan en uiteindelijk aanleiding geven tot slechts één cellijn. Zo zal de gemeenschappelijke lymfoïde progenitor (CLP) de lymfoïde lijn vormen door te differentiëren in pro-B of pro-T cellen. Die zullen later via B cel maturatie respectievelijk positieve/negatieve selectie in de thymus verder differentiëren in B- en T-cellen.

Ook vormt deze progenitor cel de natural killer (NK) cellen. Anderzijds zal de gemeenschappelijke myeloïde progenitor (CMP) alle cellen van de myeloïde lijn vormen. Via de megakaryocyt/erythroïd progenitor (MEP) zullen rode bloedcellen en megakaryocyten (MK) en dus bloedplaatjes gevormd worden. De granulocyt/macrofaag progenitor (GMP) zal aanleiding geven tot de granulocyten (basofiel, eosinofiel en neutrofiel) en monocyten en macrofagen . Aan de hand van celdelingen wordt vanuit één voorlopercel een groter aantal rijpe cellen verkregen. De cellen blijven namelijk delen tot de cel zich specialiseert, vb een rode bloedcel die Hb begint te vormen. Op die manier zullen bijvoorbeeld vanuit één voorlopercel 32 rode bloedcellen gevormd worden.



Figuur 6. Volwassen hematopoëtische ontwikkeling in het beenmerg. Afkortingen: pluripotente stamcellen (PSC), lange termijn HSC (LT-HSC), korte termijn HSC (ST-HSC), multipotente progenitor (MPP), gemeenschappelijke myeloïd/lymfoïd progenitor (CMP/CLP), megakaryocyt/erythroïd progenitor (MEP), granulocyt/macrofaag progenitor (GMP) (14).

2.3. BLOEDDONATIE

De vooruitgang in de medische wereld heeft gezorgd voor een hogere nood aan de verschillende bloedcomponenten voor transfusie. Zo worden witte bloedcellen gebruikt voor het herstellen van de immuniteit van patiënten die onder myelotoxische therapie staan en voor het versterken van de antitumorale immuunrespons (22). Ondanks de hoge nood aan bloed voor gebruik bij transfusies, blijft bloeddonatie de enige bron en is het aantal vrijwillige donors bovendien beperkt, zeker in ontwikkelingslanden. Daarnaast speelt contaminatie met onder andere HIV, hepatitis B, C en andere pathogenen een rol. Ook het tekort aan bloedcellen met

een zeldzaam fenotype en MHC incompatibiliteit zijn beperkingen verbonden aan transfusies van bloed uit bloedbanken (22, 23).

2.4. HEMATOPOËTISCHE STAMCELTRANSPLANTATIE

Een van de meest gebruikte toepassingen van stamcellen in de medische wereld is de HSC transplantatie (HSCT). Bij een autologe stamceltransplantatie zal de patiënt zijn hematopoëtisch systeem terug opbouwen aan de hand van zijn eigen stamcellen. Dit fungeert dus als een rescue therapie voor patiënten die omwille van een onderliggende maligniteit een dergelijk grote dosis chemoradiotherapie kregen dat hun hematopoëtisch systeem vernietigd werd. Patiënten die een allogene stamceltransplantatie ontvangen zullen een nieuw hematopoëtisch systeem opbouwen op basis van stamcellen van een donor. Wereldwijd worden ongeveer 50.000 patiënten per jaar met deze therapie behandeld voor zowel maligne als niet-maligne aandoeningen. Hieronder vallen onder andere leukemie, sikkelcelanemie, lymfomen, aandoeningen van het immuunsysteem en beenmerg, zoals bijvoorbeeld immuundeficiënties of thalassemia major, en zelfs HIV (24, 25). Toch zijn er enkele problemen aan deze behandeling verbonden.

Een eerste grote hindernis wordt gevormd door een tekort aan bruikbare HSCs. Navelstrengbloed, beenmerg en gemobiliseerd perifeer bloed zijn tot op vandaag de enige bronnen voor HSCs (24). Ondanks de grote vooruitgangen die met deze technieken zijn geboekt, blijven ze echter onvoldoende. Dit omwille van de beperkte aantallen HSCs en de slechte mobilisatie naar perifeer bloed ervan, belangrijk voor de veilig en niet-invasieve isolatie (26). Een tweede probleem stelt zich bij het gebrek aan diversiteit, wat van belang is voor het humaan leukocyt antigen matchen van donor en ontvanger en het ontstaan van graft versus host disease indien dit niet correct gebeurt (24-26). Voornamelijk het gebrek aan voldoende geschikte donors is het grote probleem omwille van de nood aan grote aantallen HSCs voor transplantatie (27). Zo bedraagt vb het aanvaardbaar aantal cellen, bekomen uit BM, nodig voor transplantatie $3 - 5 \times 10^8$ totaal genucleëerde cellen (TNC)/kg lichaamsgewicht. Het is duidelijk geworden dat hoe meer TNCs men bekomt en bijgevolg transplanteert, hoe beter de uitkomst, meer bepaald de algemene overleving van de patiënt (28)

Daarom werd gezocht naar manieren om een groter aantal transplanteerbare HSCs te bekomen, maar ook naar alternatieve bronnen (27). Sommige studies hebben getracht om het aantal HSCs in vitro te vergroten met onder andere de hulp van kleine molecules, zoals retinoïnezuur. Het gebruik hiervan op hematopoëtische cellen is echter nog gelimiteerd en bovendien werden hierbij ongewenste effecten geobserveerd. De ontwikkelde technieken bereiken weinig belovende resultaten gezien de expansie beperkt is. Daarnaast zijn de

verkregen HSCs functioneel beperkter dan de verse HSCs door onder andere hun verzwakte multipotentie en migratie potentieel (24, 26).

Op dit gebied kunnen pluripotente stamcellen (PSC) een uitweg bieden. Hieronder verstaan we zowel ESC als iPSC. Enerzijds kan door de differentiatie van deze PSCs naar HSCs, een alternatieve en theoretisch onbeperkte bron voor HSCT ontwikkeld worden. Anderzijds zou dit een autologe genezing kunnen bieden voor genetische hematologische aandoeningen door productie van HSCs uit iPSCs na genetische modificatie (11). Theoretisch gezien kunnen deze PSCs ook een alternatief vormen voor de problemen bij bloeddonoratie indien ze in rode bloedcellen worden gedifferentieerd. Bijkomend kan het ook bijdragen tot het onderzoek van de hematopoëse en medicijnen.

Een andere mogelijke oplossing voor bovengenoemde problemen is het direct reprogrammeren van somatische cellen naar het gewenste celtype, in dit geval cellen van de bloedlijn zonder over een staat van pluripotentie te gaan. Reeds in 1980 slaagde men erin een embryonale fibroblast van de muis te laten differentiëren in een skeletspiercel door de overexpressie van 1 transcriptiefactor, MyoD. De ontdekking van iPSC in 2006, leidde tot de idee om volwassen cellen rechtstreeks in een ander celtype te converteren door de combinatie van verschillende lijn-specifieke factoren. Zo werden onder andere exocriene pancreascellen in endocriene beta-cellen en fibroblasten in neurale cellen gereprogrammeerd. (26, 29).

3. VRAAGSTELLING

Het onderzoek van de stamcellen opende al heel wat nieuwe perspectieven in de medische wereld. Een van die perspectieven is het realiseren van gepersonaliseerde geneeskunde (*'personalized medicine'*). Zo kan het bijvoorbeeld een rol spelen in HSC transplantatie (HSCT) voor de behandeling van maligne en niet-maligne aandoeningen van het bloed. Gezien hierbij de kwaliteit en kwantiteit van HSCs een obstakel vormt, door gebrek aan bronnen voor deze HSCs en door het probleem van HLA-matching, kunnen pluripotente stamcellen hiervoor een oplossing bieden. Het doel van deze masterproef is dan ook een overzicht te bieden van de huidige stand van zaken, de progressie en obstakels om vanuit pluripotente stamcellen, HSC te vormen en bij uitbreiding alle cellen van het bloed.

4. METHODOLOGIE

Voor het vinden van gepaste literatuur werd voornamelijk de zoekmachine Pubmed gebruikt. Om verkennende literatuur over stamcellen te vinden, werden de Mesh-termen 'Pluripotent Stem Cells/cytology' en 'Nature [TA]' gecombineerd omdat in dit tijdschrift, de artikels meestal een mooi en duidelijk overzicht geven van het onderzoeksgebied.

Verder werden de termen 'Pluripotent Stem Cells' en 'Hematopoietic Stem Cells' gecombineerd en artikels geselecteerd op basis van titel in een eerste tijd en nadien lezen van abstract. Andere artikels werden uit referenties van reeds gelezen artikels gehaald. Dubbel geselecteerde artikels of artikels waarvan niet het volledige artikel beschikbaar was, werden uit de selectie gelaten.

5. RESULTATEN

Na de prelevatie van de PSCs probeert men deze via een alternatieve manier te differentiëren in de gewenste HSCs of andere HCs.

5.1. ALGEMEEN GEBRUIKT PROTOCOL

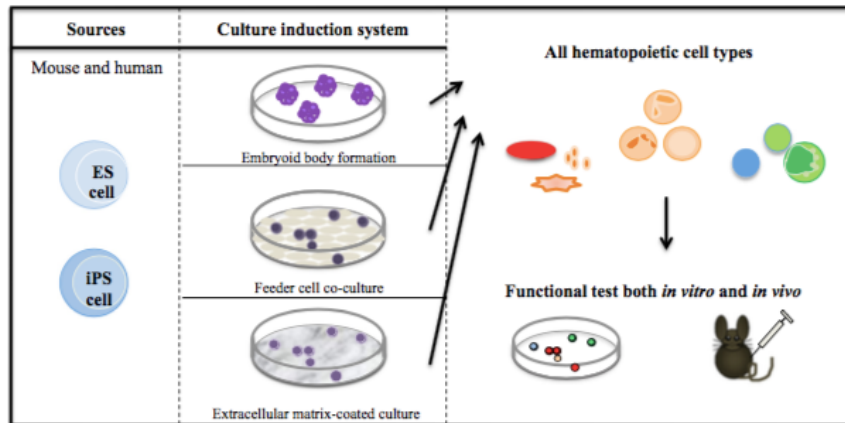
5.1.1. Differentiatie van de PSCs

5.1.1.1. In vitro differentiatie

PSCs kunnen gedifferentieerd worden in HSCs op verschillende manieren. Muriene PSCs kunnen behouden worden en zich vermenigvuldigen wanneer ze zich op een laag van mitotisch geïnactiveerde muis embryonale fibroblasten (MEF) bevinden en/of in aanwezigheid van leukemie inhiberende factor (LIF). Humane PSCs behouden een ongedifferentieerde staat op een laag van MEF en of *basic fibroblast growth factor* (bFGF). Na het verwijderen van LIF en bFGF kunnen de cellen differentiëren in eender welk celtype, afhankelijk van de kweekcondities. De in vitro differentiatie richting hematopoëtische ontwikkeling wordt door 3 technieken benaderd:

- Embryoid bodies (EBs) zijn driedimensionele aggregaten die gevormd worden door PSCs in aanwezigheid van een bepaald kweekmedium, dat, afhankelijk van het protocol, verschillende producten kan bevatten. Ze bestaan uit cellen van de drie kiemlagen. De drie meest gebruikte methodes voor de vorming van EBs zijn: kweken in aanwezigheid van een suspensie, kweken in methylcellulose halfvast medium of kweken in 'hanging drops'. Elke methode heeft zijn eigen bijzonderheid, waarbij de cellen worden gekweekt onder variërende condities. Daarom kunnen de eigenschappen van de gevormde EBs en bijgevolg de gevormde cellen hierin verschillen.
- Feeder cel co-kweek is een methode waarbij de PSCs in aanwezigheid van feeder cellagen wordt gekweekt. OP9 is een veel gebruikte feeder cellaag en is gederiveerd uit het BM van pasgeboren muismodellen die osteoporose vertonen omwille van een gebrek aan macrofaag stamcelfactor (SCF)
- Gebruik van extracellulaire matrix-gecoate platen zoals collageen en fibronectine voor de hematopoëtische differentiatie van zowel muriene als humane PSCs is een derde methode die vaak gebruikt wordt

Het hematopoëtisch inductie potentieel dat deze systemen hebben wordt doorgaans nog versterkt door toevoeging van een mix van hematopoëtische cytokines (30)



Figuur 7. Overzicht van de drie meest gebruikte inductiesystemen voor de hematopoëtische differentiatie van murine en humane PSCs (30).

5.1.1.2. In vivo teratoma-vorming

In principe kunnen HSCs ook gevormd worden uit PSCs onder experimentele condities aan de hand van in vivo teratoma vorming. Na subcutane injectie van de PSCs in immunodeficiënte muizen, kunnen ze teratoma's vormen, waaruit de gewenste HSCs dan kunnen geïsoleerd worden.

5.1.1.3. Gecontroleerde differentiatie

Door overexpressie of silencing van bepaalde genen of pathways die van belang zijn tijdens de hematopoëtische ontwikkeling, probeert men het hematopoëtisch programma in de PSCs aan te zetten en een efficiënte generatie van hematopoëtische cellen (HCs) te bekomen. In lijn hiermee tracht men, zoals reeds hoger vermeld, nu ook somatische cellen rechtstreeks te reprogrammeren naar HCs door overexpressie van bepaalde transcriptiefactoren.

5.1.2. Identificatie van HSCs

Om te testen of de verkregen cellen wel degelijk HSCs zijn, kunnen verschillende manieren gebruikt worden.

5.1.2.1. Functioneel

Zoals reeds hoger vermeld is de enige echte functionele test voor HSCs de transplantatie van de cellen in murine ontvangers. Hierin kunnen ze zelfvernieuwing ondergaan en gelijktijdig het hematopoëtisch systeem reconstrueren, door de productie van alle bloedcellijnen.

5.1.2.2. Oppervlaktemarkers

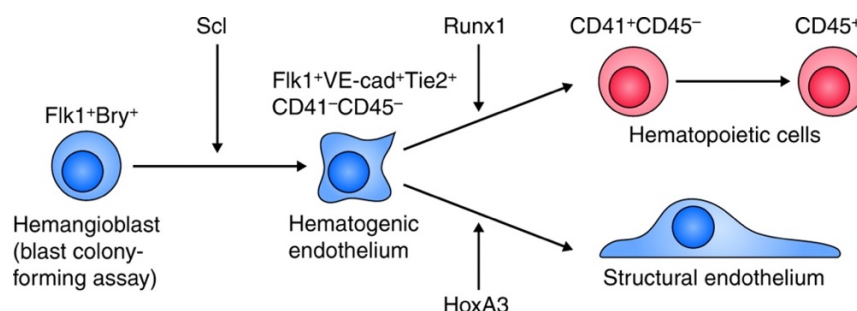
In de laatste 25 jaar werd aan de hand van de stapsgewijze identificatie van oppervlakte markers, een methode ontwikkeld om potentiële stamcellen en progenitorcellen prospectief te isoleren. Door cellen te isoleren die een bepaalde combinatie van oppervlaktemarkers dragen, kan eenvoudig het gewenste celtype geïsoleerd worden of kan getest worden met welk type cel we te maken hebben. Niet steeds dezelfde set van oppervlakte markers wordt gebruikt om

prospectief de gewenste cellen te isoleren, maar voor de meeste markers werd wel een consensus bereikt over wat de expressie ervan op de cel betekent.

- CD34 is de hematopoëtische oppervlakte marker die tot expressie komt vanaf het humane HSC-stadium. Deze marker wordt echter tijdens de gehele muriene ontwikkeling tot expressie gebracht en verdwijnt kort na de geboorte op de meest primitieve LT-HSCs (12, 31). Daarnaast komt het ook tot expressie op endotheliale cellen (32).
- CD31 komt zowel op HCs als endotheliale cellen tot expressie (32).
- CD41 is een specifieke oppervlakte marker van de hematopoëtische lijn die tot expressie wordt gebracht door HSCs en hematopoëtische progenitors (HPs) tijdens de vroege ontwikkeling. Zo is het aanwezig op muriene cellen uit E9.5 YS en E10.5-E11.5 AGM maar niet op E14.5 FL en BM-HSCs (31). Het komt tevens tot expressie op trombocyten, megakaryocyten maar niet op endotheelcellen (31, 32).
- CD43 wordt gebruikt om hematopoëtische specificatie van cellen aan te tonen en komt op zowel primitieve als definitieve hematopoëtische progenitors tot expressie (33).
- CD45, ook wel de pan-hematopoëtische oppervlakte marker genoemd, komt pas tot expressie op late AGM en FL stadia en kan dus beschouwd worden als een marker voor meer mature hematopoëtische cellen (31).
- CD235a of glycophorine-A (GlyA) is een specifieke marker voor de erythroïde lijn (33).

De hemangioblast wordt door de meeste auteurs geïdentificeerd door expressie van FLK1 (of KDR of VEGFR2) en BRACHYURY, maar ook RENIN wordt als oppervlaktemarker gebruikt (32-34).

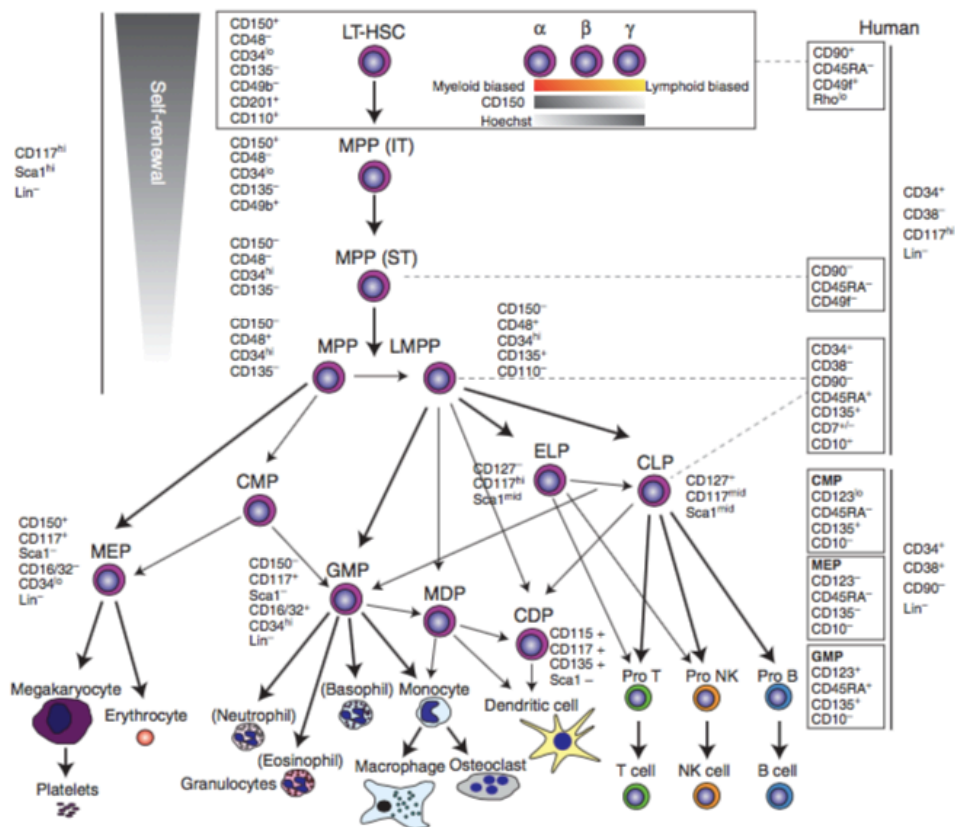
HE kan teruggevonden worden in de populatie die CD34+, CD144+, FLK1+, CD117+ (c-kit), Sca-1+, VE-cadherine + en CD45 – is. Daarnaast brengen zij ook RUNX1, SCL, GATA2 en LMO2 tot expressie (33, 35).



Figuur 8. Schematisch overzicht van de hematopoëtische ontwikkeling tijdens de embryogenese met aanduiding van belangrijke markers om deze stadia te identificeren (36).

Voor muriene HSCs beschouwt men algemeen de CD117⁺ Sca-1⁺ lijnspecifieke markers – (Lin⁻) fractie, ook wel de KSL fractie genoemd, als meest representabel. Echter, slechts 1 op 30 van deze cellen in het BM is een HSC. Het grootste percentage HSCs (ongeveer 50%) wordt gevonden in de KSL, CD150⁺, CD48⁻ en CD34 laag fractie (12). CD150 en CD48 worden ook wel de signalerende lymfocyt activatie molecule (SLAM)-markers genoemd en hun expressie verschilt afhankelijk van de hematopoëtische site. Zo worden beide markers niet tot expressie gebracht in AGM, placenta of YS. In het BM en in de FL wordt CD150 dan weer wel tot expressie gebracht, terwijl CD48 negatief blijft (31).

Humane HSCs worden teruggevonden aan een frequentie van 15% in de populatie die Rho laag, CD49f⁻, CD34⁺, CD38⁻, CD90⁺, CD45RA⁻, Lin⁻ is (12).



Figuur 9. Overzicht van de gebruikte oppervlakte markers om verschillende hematopoëtische cellen uit de volwassen muriene en humane hematopoëse te identificeren. (12)

5.1.2.3. Andere methodes

Een andere methode voor de prospectieve isolatie van HSCs is aan de hand van functionele eigenschappen, zoals de efflux van Hoechst oplossing. Verdere discriminatie kan dan nog gemaakt worden op basis van de graad van efflux, die gecorreleerd kan worden aan een sterkere myeloïde of lymfoïde differentiatie. Een ander voorbeeld is de lage kleuring van Rhodamine oplossing voor HSCs (12).

5.1.2.4. Potentieel van de HSCs

Om het patroon van proliferatie en differentiatie van de prospectief geïsoleerde, mogelijke HSCs te identificeren, worden doorgaans twee verschillende manieren gebruikt.

5.1.2.5. In vivo potentieel

Het in vivo potentieel van de in vitro geproduceerde kandidaat-HSCs kan getest worden, zoals reeds hoger vermeld, aan de hand van transplantatie experimenten in muriene ontvangers. Deze ontvangers zijn immuundeficiënt om de competitie met de eigen acceptor bloedcellen te minimaliseren. Gedurende een aantal weken kan dan de *engraftment* van de geïnjecteerde cellen gevolgd worden. Hierbij wordt uit stalen van perifere bloed of beenmerg van de ontvanger nagegaan hoeveel procent van de bloedcellen van donor-origine zijn. Daarnaast wordt ook bepaald welke bloedcellijnen precies gevormd worden door de getransplanteerde cellen. Het engraftment-percentage kan dan over een bepaalde periode gevolgd worden om te bepalen hoe lang de HSCs in staat zijn tot zelfvernieuwing. Vanuit de primaire ontvangers kunnen de nieuw geproduceerde HSCs geïsoleerd worden om te testen of deze ook in staat zijn tot engrafting in een secundaire ontvanger. Op deze manier wordt dus het in vivo potentieel van de in vitro geproduceerde cellen getest.

5.1.2.6. Colony forming cell assay

Een tweede manier om het proliferatie- en differentiatiepotentieel te testen, is door de kandidaat-HSCs in vitro te laten differentiëren in bloedcellen met behulp van de *colony forming cell (CFC) assay*. Hematopoëtische progenitor- en stamcellen (HSPC) zijn in staat kolonies van bloedcellen te vormen in aanwezigheid van een halfvast medium. Het aantal kolonies dat gevormd wordt vanuit een vastgelegd aantal HSPCs en de morfologie ervan, voorziet ons van informatie over de differentiatie- en proliferatie-capaciteit van de geteste HSPCs. Nadat de HSPCs geïsoleerd zijn, worden cytokines toegevoegd om deze te activeren. Nadien worden de cellen overgebracht naar een medium met methylcellulose, gesupplementeerd met groeifactoren. Na ongeveer 2 weken kunnen cellen vanuit individuele kolonies of vanuit de hele plaat geanalyseerd worden aan de hand van flow cytometrie en morfologisch aan de hand van Giesma-kleuring. Zo wordt bepaald met welk type bloedcel we te maken hebben. Deze assay kan gebruikt worden om de myeloïde, maar niet de lymfoïde, differentiatie te bepalen (37).

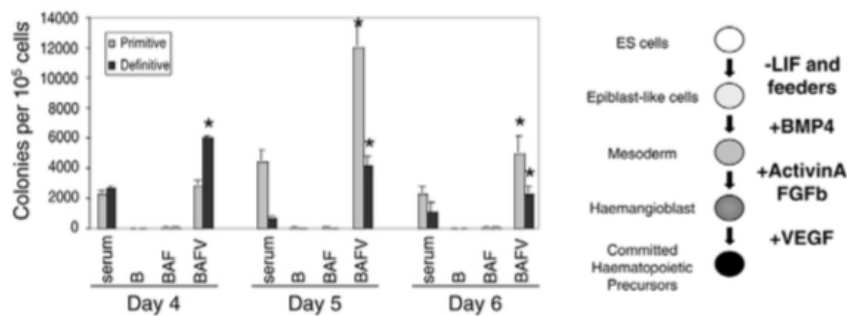
CFU-GEMM cellen zijn multipotente progenitor cellen, meer bepaald CMPs en geven aanleiding tot granulocyten, erythrocyten, monoccyten en megakaryocyten (GEMM). Deze evolueren verder naar:

- CFU-GM dat verder evolueert naar CFU-G en CFU-M die aanleiding geven tot myeloblasten (en dus neutrofielen, basofielen en eosinofielen) en monoblasten (en dus monocytten) respectievelijk.
- BFU-E, die blasten van de erythroïde lijn bevat en verder evolueert naar kolonies van erythroïde cellen, de CFU-E.
- CFU-Meg, dat aanleiding geeft tot megakaryocyten.

5.2. GEBRUIK VAN EEN GEDEFINIEERD PROTOCOL

De combinatie van BMP4, activin A, bFGF en VEGF (BAFV) bleek het effect van kweken in aanwezigheid van serum te recapitulieren voor murine ESCs. In serumvrij medium werd namelijk geen celexpansie of mesodermale inductie geobserveerd (14% FLK1+ BRACHYURY versus 0%). Zowel definitieve als primitieve kolonies werden geobserveerd bij BAFV maar aan een lagere frequentie dan bij kweken in serum. Het protocol kan onderverdeeld worden in verschillende stappen, waarbij voor elke stap slechts 1 of 2 factoren nodig zijn. Het verwijderen van LIF en kweekcellen in een eerste stap was voldoende om ESCs verder te laten differentiëren in epiblast-cellen, gezien door de opregulatie van Fgf5 (epiblast-marker) op dag 1 en 2 en downregulatie van Rex1 (ESCs marker) op dag 1 en 2 en OCT4 en NANOG op dag 3. Toevoeging van BMP4 bij de tweede stap induceerde mesodermale commitment, gelijkaardig aan dat gezien in serumcondities. Op basis van de dramatische toename van BRACHYURY+ cellen tussen dag 2 en 3 van differentiatie, werkt BMP4 waarschijnlijk via inductie van mesoderm, eerder dan overleving. Alle concentraties van BMP4 gaven een inductie van mesoderm (100% van de cellen waren BRACHYURY+) maar zowel lage als hoge concentraties waren suboptimaal. BMP4 alleen bleek echter niet voldoende voor de generatie van een hemangioblast precursor (30% bleek FLK1+ en slechts weinig blast kolonies konden gevormd worden). Wanneer na 2.5 dagen kweken met BMP4, lage concentraties van bFGF en Activin A werden toegevoegd, werd al reeds na 3 uur een sterke toename in hemangioblastvorming geobserveerd. Deze hemangioblasten gaven aanleiding tot zowel primitieve en definitieve hematopoëtische progenitors (HPs) als endotheliale cellen (EC). Dit aantal lag wel lager dan wanneer gekweekt werd in serumcondities. De hemangioblasten waren niet in staat om verder te differentiëren naar meer mature HPs in aanwezigheid van enkel deze 3 factoren. Toevoeging van VEGF bleek voldoende voor de progressie van hemangioblast naar meer mature HPs. BAFV-EBs bleken meer primitieve en definitieve HPs te genereren dan serum-EBs. Hierbij speelt vooral de timing van toevoeging van VEGF een belangrijke rol, gezien de beste resultaten werden bereikt wanneer VEGF samen met bFGF en Activin A werd toegevoegd. Op dag 6 bleken de meeste cellen in BAFV-EBs een hematopoëtische identiteit te hebben (CD41+) en vanaf dag 7 observeerde men meer mature HPs (CD45+). Alle HPs

werden gevonden in de CD41+ fractie, waarbij de CD34- fractie de grootste was en deze bevatte zowel primitieve als definitieve HPs. Deze genereerden voornamelijk immature blasten met enkele meer mature cellen maar geen megakaryocyten. B en T cel potentieel werd ook niet geobserveerd. De CD41+CD34+ bevatte enkel definitieve progenitors. Na analyse van het moleculair programma bleken Activin A en bFGF inderdaad het hematopoëtische programma aan te zetten in mesodermale precursors, gezien door de opregulatie van cruciale TFs van dat programma. Ook de cruciale rol van VEGF in het behoud, eerder dan de inductie, van het hematopoëtische programma werd hierbij bevestigd (38).



Figuur 10. Aantal kolonies per 10⁵ cellen bekomen na differentiatie in serum, met BMP4 alleen (B), BMP4, Activin A en bFGF samen (BAF) of BMP4, Activin A, bFGF en VEGF samen (BAFV) van BRACHYURY+ ESCs. Primitive: primitieve erythrocyten, definitive: alle definitieve kolonies (macrofaag, macrofaag/erythrocyt, gemengde en granulomacrofage kolonies) (links). Schematisch overzicht van het gebruikte protocol (rechts) (38).

Ook voor humane PSCs kon een efficiënt protocol gedefinieerd worden dat bestaat uit 3 cruciale momenten: differentiatie, isolatie en expansie. Ondanks dat men gebruik maakte van iPSCs uit chimpansees, zou dit toch kunnen doorgetrokken worden naar het humane programma. BMP4 werd gebruikt voor de mesodermale inductie. Omdat de optimale concentratie verschilt voor elke cellijn, werden 3 concentraties getest (10, 20 en 50 ng/ml). Hoge concentraties BMP4 gaf een robuuste expressie van CD34+ op dag 14 en 21 (30-45%). Ondanks dat het aantal CD34+ cellen groter was op dag 21, werden de meest leefbare cellen gegenereerd op dag 14 (voor 20 ng/ml werden 1,5 miljoen CD34+ cellen uit 1 miljoen MniPSC verkregen). Slechts 5% waren CD31+CD45+. CFU potentieel piekte op dag 14, 90% CFU-M en 10% CFU-GM, en was significant groter voor cellen geïnduceerd met 20 ng/ml BMP4, overeenkomstig met het grootste aantal CD34+ leefbare cellen. De korte termijn behandeling met PGE2 of SR1, die betrokken zijn in de activatie van downstream pathways van belang voor HSC ontwikkeling en homeostase respectievelijk, versterkten de CD34+ generatie. PGE2 zorgde voor een 3 maal hogere CD34+ yield en 4 maal meer primitieve HCs (CD34+CD45+), terwijl SR1 voor een 2 maal hoger aantal primitieve HCs zorgde zonder negatieve impact op CD34+. PGE2 behandeling tot dag 8 had geen invloed op CFU-potentieel maar langer zorgde dit voor een daling in CFU-potentieel terwijl SR1 behandeling het aantal CFUs liet stijgen.

Isolatie van CD34+ cellen op dag 8 bleek de hematopoëtische specificatie en lijncommitment te versterken. Een groter aantal CD34-CD45+ cellen werd bekomen na purificatie (45% versus 2%) en deze cellen zijn in staat te differentiëren in de myeloïde en lymfoïde lijn. CFUs geproduceerd vanuit de gesorteerde fractie lag 4 maal hoger dan bij de niet-gesorteerde CD34+ cellen. Het volgende protocol wordt dus voorgesteld: 1. mesodermale inductie door toevoeging van BMP4 aan 20 ng/ml op dag 0 en 1. 2. hematopoëtische specificatie door PGE2 toevoeging van dag 1 tot 7. 3. purificatie van de CD34+ fractie en 4. CD34+ cel expansie in normoxie met SR1. Deze laatste bleek echter het aantal CD34+ cellen 3 maal meer te expanderen onder normoxische condities (39).

5.3. INVLOED VAN DE MICRO-OMGEVING

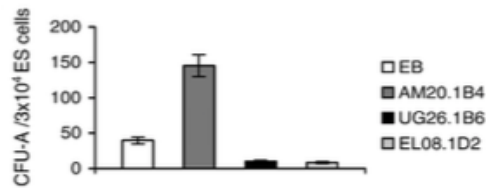
5.3.1. Gebruik van hematopoëtische niches

Gezien tijdens de embryonale ontwikkeling de hematopoëtische cellen ontwikkelen op specifieke plaatsen in het embryo, is het aannemelijk dat deze 'hematopoëtische niches' alle nodige signalen voorzien om de ESCs efficiënt te laten differentiëren in HSCs in vivo. Vanuit deze bedenking, hebben verschillende onderzoeksgroepen geprobeerd om de efficiëntie van de in vitro generatie van HSCs te vergroten door de PSCs te laten differentiëren in de nabijheid van hun in vivo micro-omgeving.

5.3.1.1. AGM en FL

Voor muriene ESCs toonde men aan dat het kweken ervan samen met primaire cellen uit de AGM regio een significante toename in hematopoëtische activiteit gaf, gezien er meer hematopoëtische kolonies gevormd konden worden. Het grootste inductief effect werd gevonden wanneer men gebruik maakte van cellen uit de AGM regio vroeger in de ontwikkeling. Cellen uit de E10.5 AGM regio gaven namelijk een 10 voudige toename van het aantal kolonies terwijl cellen uit de E11.5 AGM regio slechts een 2 voudige toename vertoonden. Als men gebruik maakte van stromale cellen uit dezelfde AGM regio, gaf dit opnieuw een significante toename in hematopoëtische activiteit, maar de toename in het aantal kolonies lag lager dan wanneer gewerkt werd met primaire cellen (3.5 voudige toename). De gevormde kolonies waren van het CFU-GEMM en CFU-GM type (40).

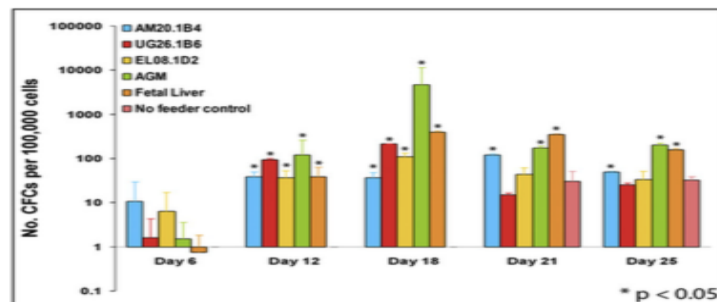
Primaire cellen uit de FL regio waren niet in staat een significant hematopoëtisch inductief effect uit te oefenen bij co-kweek ervan met mESCs. Ondanks dat stromale cellen uit de FL regio en de urgonitale groeve de nodige signalen voor het behoud van volwassen BM-HSCs kunnen voorzien, waren deze cellijnen niet in staat voor een hoger aantal hematopoëtische kolonies te zorgen in co-kweek met mESCs. Ook de proportie cellen die CD45, c-kit en Sca-1 tot expressie brachten was lager bij dit co-kweek systeem (40).



Figuur 11. Aantal CFUs geproduceerd door co-kweken van mESCs met stromale cellijnen uit de AGM regio (AM20.1B4), urogenitale groeve (UG26.1B6) en de foetale lever (EL08.1D2) met embryoïd body (EB) vorming van de mESCs als controle (40).

Voor humane ESCs nam men, in tegenstelling tot mESCs, wel een toename in aantal hematopoëtische en endotheliale cellen waar wanneer zij met primaire cellen uit de FL regio werden gekweekt. De significantie was echter opnieuw lager dan wanneer primaire AGM cellen werden gebruikt. Ook het aantal kolonies lag hoger bij co-kweek met cellen uit de AGM regio en deze vertoonden naast CFU-G, CFU-M, CFU-GM en CFU-GEMM ook CFU-E en BFU-E, wat niet terug te vinden was bij co-kweek met FL weefsel (41).

Co-kweken van stromale cellijnen met hESCs leverde ook een significante toename van het aantal kolonies op, maar deze significantie verdween voor de cellijnen uit FL en urogenitale groeve bij langere differentiatieperiodes. Dit suggereert verder dat enkel de cellijn uit de dorsale aorta een blijvend hematopoëtisch inductief effect heeft. De twee mesodermale markers BRACHYURY en MIXL1 waren het sterkst geactiveerd tijdens co-kweek met de cellijn uit de dorsale aorta, die ook een latere piek in CD34+ expressie en kolonievorming toonde. Dit suggereert dat deze cellijn de mesoderm vorming uit hESC sterker promoot en waarschijnlijk minder gedifferentieerde HPs genereert (41).



Figuur 12. CFC-activiteit van differentiërende hESCs op stromale cellen in vergelijking met feeder-vrije controles (41).

Bij intrafemorale injectie van hESC-gederiveerde cellen in immuungedepimeerde muizen, werd gezien dat de overleving van de muizen het hoogst was in geval van primaire cellen uit AGM en FL en de stromale cellijnen uit dorsale aorta en urogenitale groeve. Het hoogste percentage CD45+ cellen in PB werd geobserveerd bij hESC gedifferentieerd in nabijheid van de cellijn uit de dorsale aorta in vergelijking met de andere co-kweek systemen. Secundaire

ontvangers vertoonden ook hESC gederiveerde humane cellen, wat de aanwezigheid van hESC-HSCs in de co-kweek systemen aantoont (41).

Uit deze resultaten blijkt dus dat co-kweken van muriene of humane ESCs met delen uit de AGM regio zorgt voor een sterke hematopoëtische inductie. Primaire cellen uit de AGM regio vroeger in de ontwikkeling hebben een groter inductief potentieel dan stromale cellen uit deze regio of primaire en stromale cellen uit andere regio's, zoals de FL en de urogenitale groeve. Het is mogelijk dat de AGM regio hiervoor zorgt door een sterkere commitment van de ESCs naar mesoderm te promoten. Bovendien worden hierbij wel degelijk HSCs gevormd die in staat zijn tot repopulatie in secundaire ontvangers.

5.3.1.2. Beenmerg

Co-kweken van humane ESC cellijnen samen met onveranderd beenmerg van dezelfde donor bleek ook een positieve invloed te hebben op de hematopoëtische differentiatie van deze cellen. 3.19% van de cellen waren CD34+ en het percentage CD34+ CD45+ cellen nam gradueel toe met de tijd. Na verdere differentiatie gaven deze cellen aanleiding tot erythroïde cellen (GlyA), myeloïde cellen (CD15+) en megakaryocyten (CD41a+). Er werden ook 1% CD34+/CD45- cellen geobserveerd, die waarschijnlijk kunnen omschreven worden als endotheliale progenitor cellen. (42)

Het samen kweken van muriene ESCs met een medium, geconditioneerd door endotheliale cellen uit het beenmerg (BM) van muizen (mBMEC-CM), gaf eveneens een sterkere hematopoëtische differentiatie. Er werd namelijk een groter aantal CD34+ cellen, totaal aantal kolonies en BFU-Es geobserveerd. Deze aantallen lagen nog hoger wanneer nog eens medium geconditioneerd met stromale cellen uit de FL (FLSC-CM) werd toegevoegd. De gegenereerde cellen uit deze groep zorgden daarnaast voor een hogere overleving van hun muriene ontvangers (6/8 tegenover 2/7) en produceerden een significant hoger aantal CFU-GM en BFU-Es, waarbij ook beta-H1 mRNA en dus volwassen Hb, werd gedetecteerd. Dit mRNA was niet terug te vinden in de controle groep (43).

Tabel 1. Vergelijking van de promotie van hematopoëtische differentiatie van ESCs in de 4 groepen

Group	cell number (×10 ⁴)	CD34 ⁺ number (×10 ⁴)	HPP-CFC(number/10 ⁵)	BFU-E(number/10 ⁵)
mBMEC-CM + FLSC-CM group	34.25 ± 1.59 * ** * Δ Δ	23.63 ± 1.10 * ** * Δ Δ	97.33 ± 11.78 * ** * Δ Δ	555.50 ± 5.29 * ** * Δ
mBMEC-CM group	20.92 ± 2.05 * ** *	13.07 ± 1.28 * ** *	74.67 ± 8.26 * ** *	447.60 ± 65.09 * ** *
FLSC-CM group	2.58 ± 0.70	0.62 ± 0.17	0.00	113.50 ± 21.97
Control group	3.50 ± 0.72	0.75 ± 0.15	0.00	119.83 ± 29.21

Compared with control group, * * P < 0.01; Compared with FLSC-CM group, ## P < 0.01; Compared with mBMEC-CM group, Δ P < 0.05, Δ Δ P < 0.01

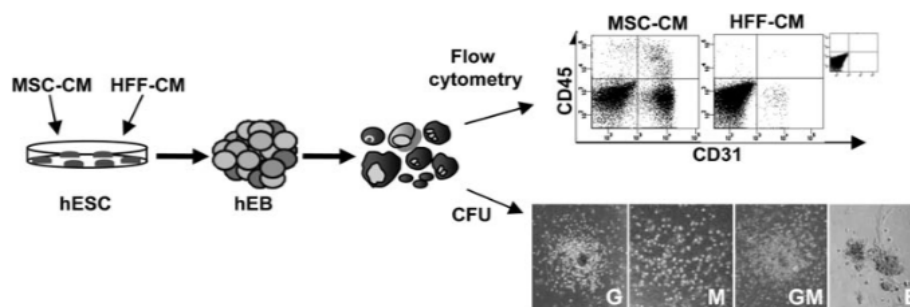
Afkortingen: murien beenmerg endotheliale cel geconditioneerd medium (mBMEC-CM), foetale lever stromale cel geconditioneerd medium (FLSC-CM) (43).

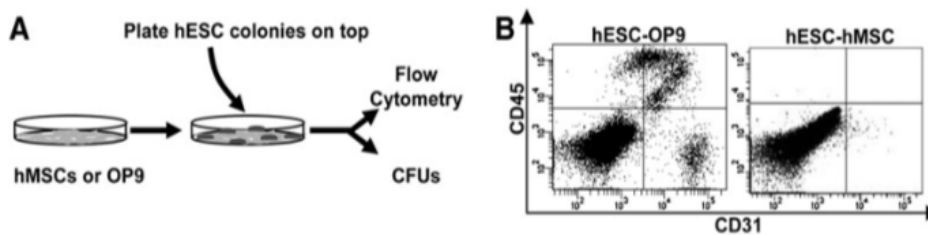
Beenmerg of media afgeleid uit componenten van dit BM zijn dus in staat de hematopoëtische differentiatie van zowel murine als humane ESCs te versterken. De resultaten tonen ook aan dat de verkregen cellen uit deze kweeksystemen in staat zijn de functie van HSCs uit te voeren.

5.3.1.3. Mesenchymale stamcellen

Humane mesenchymale stamcellen (hMSCs) zijn multipotente cellen die deel uitmaken van de HSC niches. Ze zijn van mesodermale oorsprong en hebben een sleutelrol in de regulatie van hematopoëse. Zo produceren zij hematopoëtische cytokines, ondersteunen ze HPs in vitro en hebben ze immuunosuppressieve eigenschappen. Daarnaast kunnen zij, zoals reeds hoger vermeld, de hematopoëtische engraftment na HSCT versterken (44).

Het gebruik van een medium geconditioneerd met hMSCs (hMSC-CM) om humane ESCs te laten differentiëren zorgde voor een hogere hematopoëtische differentiatie van de pluripotente cellen. Dit was af te leiden uit het hoger aantal hemogene precursors (CD45⁻ CD31⁺, 3.5-voudige toename), primitieve bloedcellen (CD45⁺ CD34⁺, 10-voudige toename), mature bloedcellen (CD45⁺ CD34⁻, 8- tot 10-voudige toename) en CFUs (3- tot 4-voudige toename) dan wanneer men kweekte met een medium geconditioneerd door humane voorhuid fibroblasten (HFF-CM), dat het meest gebruikte humane kweekmedium is voor hESCs. Er werd geen verschil in CFU-types gevonden tussen beide groepen. Ook analyse van mesoderme transcriptiefactoren (TFs) (BRACHYURY en MIXL1), vroege (SCL en RUNX1) en late (GATA1 en PU1) TFs toonde aan dat deze sneller en sterker tot expressie werden gebracht in de hESC-MSC-CM co-kweek. Dit effect werd echter enkel geobserveerd wanneer de hESCs eerst gehouden werden in aanwezigheid van dit hMSC-CM en dan pas differentiatie laten ondergaan. Wanneer er een fysieke interactie tussen MSCs en hESCs tot stand werd gebracht, gaf dit helemaal geen hematopoëtische differentiatie. Samen met de observatie dat blootstelling van differentiërende hEBs, die weinig doorlaatbaar zijn voor gesecreteerde factoren, aan MSC-CM niet voor een hematopoëtische differentiatie zorgde, kunnen we hieruit besluiten de versterkte hematopoëtische differentiatie gemedieerd wordt door gesecreteerde factoren van de MSC (44).





Figuur 13. Schematisch overzicht van het gebruikte protocol met de resultaten van flow cytometrie en CFU-assay. Afkortingen: mesenchymale stamcel geconditioneerd medium (MSC-CM), humane voorhuid fibroblast geconditioneerd medium (HFF-CM) (44).

hESCs gekweekt in MSC-CM bleken een 17% lagere algemene methylering te vertonen in vergelijking met die gekweekt in HFF-CM. Deze demethylering draagt mogelijk bij tot de expressie van belangrijke genen die een rol spelen in mesodermale en hematopoëtische lijn specificatie. Na analyse van de gedemethyleerde promotors, bleken deze geassocieerd te zijn met genen die een rol spelen in de ontwikkeling en functie van het hematologisch systeem. Zo werd gevonden dat LEFTY1 gedemethyleerd was in vergelijking met de hESC-HFF-CM en een 25-voudige opregulatie vertoonde, wat de rol van de Activin/Nodal (A/N) pathway in embryonale hematopoëse suggereert (44).

Het behoud van hESCs in MSC-CM zorgt dus voor een robuuste toename in hematopoëtische specificatie en dit proces wordt waarschijnlijk gemedieerd door gesecreteerde factoren. Deze zouden, via aanpassing van de DNA methylering, de ongedifferentieerde hESC een identiteit geven waarbij de hESCs beter richting de hematopoëtische lijn differentiëren.

5.3.2. Transplantatiemodel

Een andere mogelijke variabele in de efficiënte generatie van bruikbare HSCs, is het type ontvanger. Gezien in vele studies nog geen volledig mature HSPCs worden gevormd, is het mogelijk dat door deze eerst te laten matureren in hun ontwikkelings specifieke niche, zij verder kunnen ontwikkelen naar definitieve HSCs zoals die in vivo voorkomen.

Bij het injecteren van de CD34⁺ CD38⁻ cellen in foetussen van schapen in utero, bleek dit te zorgen voor een engraftment van CD34⁺ of CD45⁺ cellen van 1% in BM en/of PB 5 tot 17 maanden na transplantatie. Zowel lymfoïde als myeloïde cellen konden geobserveerd worden. De CD34⁺ CD38⁻ cellen werden bekomen na co-kweken van hESCs met de muriene BM stromale cellijn S17. 1 jaar na transplantatie bleken de CD34⁺ cellen ook in staat tot het engraften van een secundaire ontvanger. Het percentage nam echter wel geleidelijk af met de tijd, maar na stimulatie met GM-SCF kon dit percentage terug oplopen in BM, maar niet in PB. Myeloïde kolonies die humaan DNA bevatten konden gevormd worden en deze vertoonden een hoger aantal progenitors na stimulatie met GM-CSF (45).

Tabel 2. Chimerisme in primaire schapen die getransplanteerd werden met hESC-gederiveerde HSCs.

Animal no.	No. H1 passages	Cell type	No. cells	Chimerism in BM by PCR, %* (time, mo)	Chimerism by FACS, % (time, mo)†	
					BM	PB
1748	56	CD34 ⁺ /Lin ⁻	140 000	0.05 (39)	0.1 (10)	0.1 (10)
1749	56	CD34 ⁺ /Lin ⁻	140 000	0 (39)	0.1 (10)	0.1 (10)
1757	56	CD34 ⁺ /Lin ⁻	100 000	+ ‡ (6)	0 (5)	0.1 (5)
1838	35	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	95 000	0.04 (35)	0 (7)	0 (7)
1871	45	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	26 500	0 (34)	0 (6)	0 (6)
1885	48	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	63 000	0.09 (33)	0.1 (17)	0.2 (17)
1886	49	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	70 000	0.001 (33)	0.1 (17)	0.1 (17)
1887	49	CD34 ⁺ /CD38 ⁻	70 000	0.001 (33)	0 (17)	0.1 (17)

Afkortingen: polymerase chain reactie (PCR), beenmerg (BM), perifeer bloed (PB), aantal maanden (mo) (45).

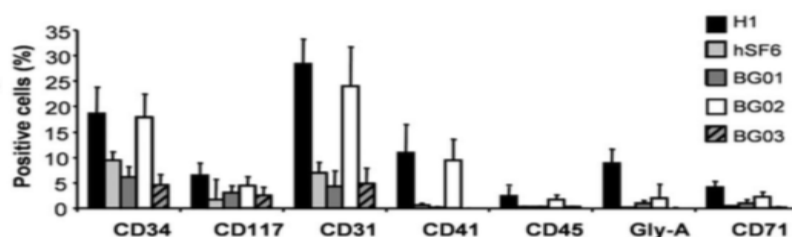
De micro-omgeving van een schaap kan dus fungeren als niche voor het behoud van progenitors, die in staat zijn tot proliferatie na stimulatie met GM-SCF maar een gelimiteerde differentiatie vertoonden omwille van de afwezigheid van humane cytokines. Aangezien de hematopoëse opgevolgd werd voor lange tijd (22m), ging het hier wel degelijk om stamcellen en niet gewoon om HPs (45).

5.4. INVLOED VAN DE GEBRUIKTE PSCS

Zoals reeds hoger vermeld, zijn er bepaalde verschillen in de eigenschappen tussen murien en humane ESC, alsook tussen ESCs en iPSCs. In verschillende studies met PSCs, bekwamen niet steeds eenzelfde resultaat bij eenzelfde uitgevoerde experiment. Uiteraard kan dit eenderzijds liggen aan variaties door toedoen van onderzoekers. Een andere mogelijkheid is een variatie in de capaciteiten van verschillende cellijnen binnen humane of muriene ESCs of iPSCs.

5.4.1. ESC lijnen

Ondanks dat verschillende hESC lijnen in staat waren tot differentiëren in de drie kiemlagen, verschilde de efficiënte van deze differentiatie toch van lijn tot lijn. Dit was duidelijk door het verschil in expressie van verschillende markers zoals AFP (endoderm), NFH (ectoderm), BRACHYURY en RENINE (mesoderm). Ook specifiek het potentieel om te differentiëren tot HCs leek verschillend over de verschillende lijnen, waar CD34, CD31, CD41, CD45 en GlyA sterker tot expressie kwamen op cellijnen die ook een hogere expressie vertoonden van hematopoëtisch TFs, zoals GATA1, GATA2 en SCL en een hoger erythroïd differentiatiepotentieel hadden (32).



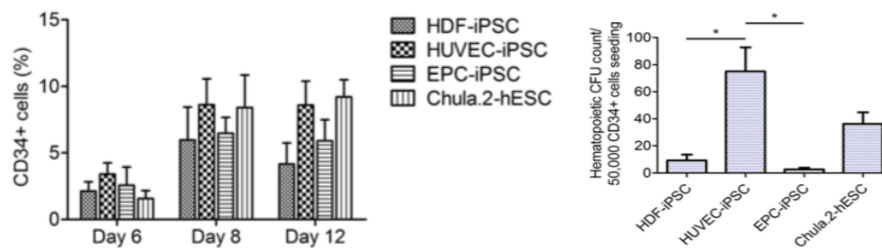
Figuur 14. overzicht van het percentage van cellen, bekomen op dag 14 van EB differentiatie van verschillende hESC lijnen, die positief waren voor aangegeven oppervlakte markers (32).

5.4.2. iPSCs

Ook tussen verschillende iPSC cellijnen verschilt het hematopoëtisch differentiatiepotentieel en dit zou te wijten zijn aan de keuze van het somatische celtype dat gebruikt wordt om iPSCs te vormen. Zoals reeds hoger vermeld, behouden iPSC een bepaald epigenetische geheugen of bepaalde DNA methylatie dat ervoor zorgt dat de daaropvolgende differentiatie van de iPSCs meer in de richting van de cel van oorsprong gebeurt.

5.4.2.1. Vanuit endotheliale cellen

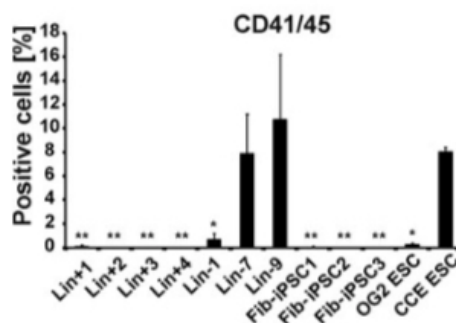
Men zag dat na reprogrammatie van humane endotheliale cellen uit de vena umbilicalis (HUVEC), endotheliale progenitor cellen (EPCs) en humane dermale fibroblasten (HDFs) naar iPSCs, er een verschil in differentiatiepotentieel tussen deze cellijnen bestond. HUVEC-iPSCs en hESCs bleken een groter potentieel tot differentiatie in CD34+ cellen te vertonen dan EPC-iPSCs en HDF-iPSCs. Als de CD34+ cellen werden onderverdeeld in CD31+ (endotheliaal) en CD43+ (hematopoëtisch) cellen, bleken alle cellen een gelijkaardig aantal CD31+ cellen te vertonen, maar HUVEC meer CD43+ cellen te geven dan de andere twee lijnen. De HUVEC-iPSCs kon aanleiding geven tot HSPCs, gezien door de CFC assays. Zij gaven meer hematopoëtische CFUs dan hESCs, HDF-iPSCs en EPC-iPSCs, maar enkel CFU-GM en BFU-E vorming werd gezien. In tegenstelling, bleek HUVEC-iPSCs en EPC-iPSCs hogere aantallen endotheliale CFUs te vormen dan de andere cellijnen. Na analyse van de expressie van endotheliale (ANGPT1 en VEGFA) en hematopoëtische (RUNX1 en GATA2) genen, bleek HUVEC-iPSCs en EPC-iPSCs een lagere methylatie en dus hogere expressie van de endotheliale genen te vertonen. Dit suggereert dat deze cellen een epigenetisch geheugen behouden dat ervoor zorgt dat ze eerder in endotheliale richting laat differentiëren (46).



Figuur 15. Percentage CD34+ cellen na differentiatie van verschillende iPSC lijnen op OP9, bekomen na reprogrammatie van humane dermale fibroblasten (HDF-iPSC), humane vena umbilicalis endotheliale cellen (HUVEC-iPSC) en endotheliale progenitor cellen (EPC-iPSC) met een hESC lijn als controle (Chula.2-hESC) op verschillende tijdstippen (links). Aantal hematopoëtische kolonies gevormd door de verschillende iPSC lijnen per 50 000 CD34+ cellen (46).

5.4.2.2. Vanuit hematopoëtische cellen

Het belang van de cel van oorsprong voor reprogrammatie werd verder bevestigd in een murine setting, waarbij BM cellen gereprogrammeerd werden. Niet alleen konden deze cellen een efficiëntere reprogrammatie ondergaan dan iPSCs uit fibroblasten (Fib-iPSC), zij hadden ook een gelijkaardig hematopoëtisch differentiatie potentieel als een mESC lijn, die gekend is omwille van zijn hoog hematopoëtisch potentieel. Dit was echter enkel duidelijk wanneer meer primitieve cellen, die nog geen specifieke lijnmarkers vertonen (Lin-), uit het BM gebruikt werden voor reprogrammatie. CD41+ cellen werden namelijk in grote aantallen gevonden in de Lin- groep, zoals bij ESCs maar in lagere aantallen in de Lin+ groep en de Fib-iPSC. De verschillen waren nog groter bij analyse van de CD41+CD45+ cellen, die volledig afwezig waren in de Lin+ en Fib-iPSCs en in grote aantallen in de Lin- en ESC groep. Het aantal kolonies in de Lin- en ESC groep lag significant hoger en deze waren van myeloïde, erythroïde of gemengde oorsprong. Na analyse van het epigenetisch geheugen, bleek een hoger niveau van methylatie in de Lin- groep en een intermediaire methylatie in de Lin+ groep te bestaan van Cxcr4, in vergelijking met de Fib-iPSCs en ESCs. Cxcr4 wordt aanzien als een hematopoëtisch-geassocieerd gen (34).



Figuur 16. Percentage CD41+CD45+ cellen over de verschillende lijnen (34).

Omwille van de epigenetische status van MSCs, kan deze cel beschouwd worden als de ideale kandidaat voor reprogrammatie en bijgevolg generatie van CD34+ cellen. Gebruik van deze cel als startcel, bleek inderdaad voor een significante toename in hematopoëtische activiteit te zorgen. De proportie CD34+ cellen bereikte 2.1% en 1.3% voor de hMSC-iPSC en hFib-iPSC respectievelijk. Dit percentage liep nog verder op naar 19.3% en 13.2% wanneer men gebruik maakte van een specifieke inductie-cocktail (BAFV). Het aantal hematopoëtische kolonies was ook hoger voor de hMSC-iPSC groep en bevatte BFU-E, CFU-E, CFU-G, CFU-GM en CFU-GEMM (47).

De cel die gekozen wordt voor reprogrammatie speelt dus duidelijk een rol. Cellen die reeds een hematopoëtische identiteit hebben, lijken na reprogrammatie makkelijker te differentiëren in de hematopoëtische lijn. Uit de resultaten blijkt ook dat het gebruik van cellen die vroeger in de ontwikkeling voorkomen een efficiëntere reprogrammatie en vervolgens hematopoëtische differentiatie vertonen.

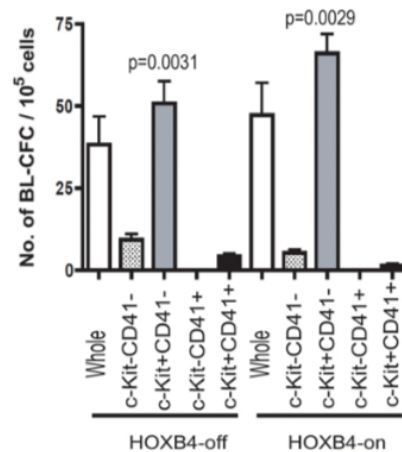
5.5. OVEREXPRESSIE OF SILENCING VAN GENEN DIE EEN ROL SPELEN IN DE HEMATOPOËSE

5.5.1. HOXB4

HOXB4 is een van de genen uit de cluster van homeobox B genen op chromosoom 17 en codeert voor een eiwit dat fungeert als transcriptiefactor aan de hand van een DNA-bindingsdomein (48). HOXB4 komt tot expressie in het mesoderm van de primitieve strook voor het verschijnen van HPs. Vanuit deze observatie, is het aannemelijk dat HOXB4 de hematopoëtische differentiatie van ESCs kan versterken door tijdens het mesodermale stadium de expressie van bepaalde genen te beïnvloeden (49). Daarnaast zorgt de ectopische expressie ervan in volwassen BM cellen tot een sterke HSC expansie, zowel in vitro als in vivo (48). Ook muizen zonder expressie van dit gen vertonen een verminderde cellulariteit van de hematopoëtische organen en minder HPs (50). Omwille van deze waarnemingen, werd getracht de in vitro generatie van HCs uit PSCs te versterken door dit gen tot overexpressie te brengen.

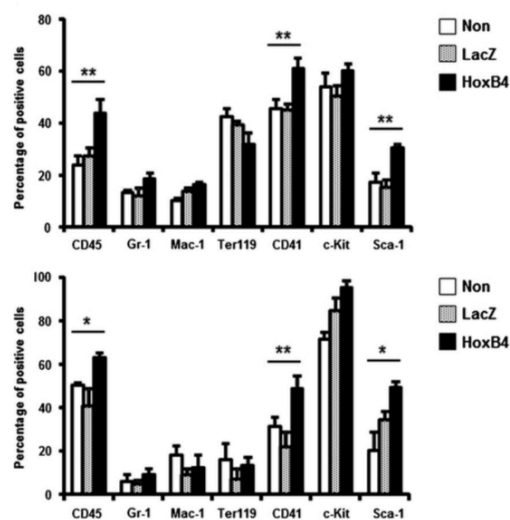
Muriene ESCs bleken een hoger aantal HCs te bevatten wanneer ze in aanwezigheid van HOXB4 werden gedifferentieerd en na transplantatie ook een hoog HOXB4 signaal ontvingen. De c-kit+CD41+ fractie bleek cellen te bevatten met LT repopulatie-activiteit, gezien na analyse van het PB op week 16 na transplantatie. De myeloïde lijn overheerste echter. Na uitschakelen van HOXB4 expressie, nam het aantal CD41+, c-kit+ en CD34+ cellen af, wat suggereert dat HOXB4 expressie de CD41+c-kit+CD45- populatie onderhoudt en CD34 expressie op reguleert tijdens co-kweek. Omdat geweten is dat FL-HSC CD34 expressie

vertonen maar volwassen BM-HSC bijna niet, kunnen we hieruit afleiden dat HOXB4 overexpressie de HSCs van een eerder immatuur fenotype voorziet. Ook de DNA methylatie vertoonde een patroon gelijklopend met de merkbare toename in CD34+ repopulerende cellen en afname in primitieve erythroïde progenitors bij HOXB4 overexpressie (51).



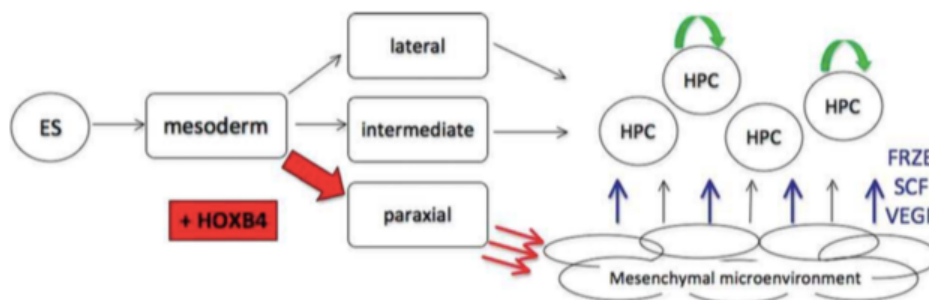
Figuur 17. Kolonievormingspotentieel van de verschillende fracties op dag 6 van EB formatie met of zonder aanwezigheid van HOXB4 (51).

Ook de transiënte expressie van HOXB4 in mESC en miPSC zorgde voor een significant hoger aantal HCs. Deze hadden opnieuw een immatuur fenotype, duidelijk door de toename in Sca-1 expressie. Het aantal kolonies was groter in de getransduceerde cellen, zowel voor ESC als iPSC maar er werd enige variatie gezien tussen de twee iPSC lijnen. Vooral de meest immature multipotente progenitors waren het sterkst toegenomen en waren voornamelijk van myeloïde oorsprong (48).



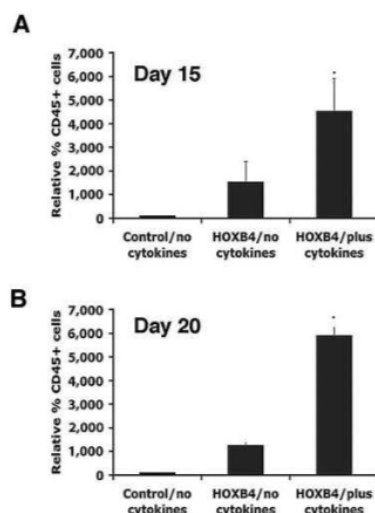
Figuur 18. Percentage van ESC-gederiveerde (bovenaam) en iPSC-gederiveerde (onderaan) cellen positief voor aangegeven markers bij transiënte overexpressie van HOXB4 in vergelijking met niet-getransduceerde of vector-getransduceerde cellen (LacZ) (48).

Na gen-analyse bleken de top 5 opgeregeerde genen voor te komen in de primitieve strook, zoals *frzb*. Genen betrokken in de vorming van mesoderm, zoals *brachyury*, *wnt3* en *Bmp4* bleken niet op geregeerd te worden door *HOXB4* maar genen betrokken in celbeweging nadat mesoderm gevormd is wel. Omdat genen die tot expressie worden gebracht in de laterale plaat onaangetast bleven en genen betrokken bij paraxiaal mesoderm wel op geregeerd werden, werd gehypotheesd dat *HOXB4* mogelijk de expressie van genen gerelateerd aan de ontwikkelende micro-omgeving induceert. In deze lijn, werd ook gezien dat *SCL* en *VEGFA* (liganden voor *c-kit* en *FLK1*) secretie toegenomen waren. De hematopoëtische inductie zou mogelijk het gevolg zijn van een paracrine secretie van *Frzb*, een onderdeel van de WNT/betacatenine (WNT/B) pathway. *HOXB4* getransduceerde cellen zijn namelijk in staat de hematopoëtische differentiatie in naburige ESCs (die geen *HOXB4* tot overexpressie brengen) te versterken. Wanneer enkel *Frzb* tot expressie wordt gebracht, en dus niet *HOXB4*, heeft dit namelijk ook een versterkte hematopoëtische differentiatie. *Frzb* wordt opgeregeerd door *HOXB4*, de knockdown ervan blokkeert hematopoëtische differentiatie en *HOXB4* en *Frzb* komen tot expressie in embryonale hematopoëtische niches (49).



Figuur 19. Schematisch overzicht van de manier waarop *HOXB4* zijn versterkt hematopoëtische differentiatie uitvoert, door moduleren van de micro-omgeving (49).

In humane ESCs werden gelijkaardige resultaten gevonden. Overexpressie van *HOXB4* geeft ook daar een hogere hematopoëtische activiteit. Het aantal CD45 cellen was daar namelijk hoger (4.2 – 21.1% tegenover 0.6 – 0.7%) en deze toename in HCs bleek nog versterkt te worden door toevoeging van hematopoëtische cytokines. Het aantal hematopoëtische kolonies was ook hoger bij overexpressie van *HOXB4* (83 – 795, tegenover 24 – 83 kolonies per 10^6 cellen) en het type kolonie veranderde met de differentiatie. BFU-E piekten vroeger in de differentiatie dan CFU-GM en CFU-M. De efficiëntie verschilde echter over de verschillende *HOXB4*-hESC lijnen maar een overheersing van de myeloïde en monocytair kolonies was duidelijk (50).



Figuur 20. Relatieve percentage CD34+ cellen na differentiatie van hESCs in aanwezigheid van HOXB4 met of zonder toevoeging van cytokines en in afwezigheid van HOXB4 en cytokines als controle op dag 15 (A) en dag 20 (B) (50).

De 20 sterkst gebonden genen bleken geen functie te hebben in HSCs. Echter, bepaalde genen die een 4 tot 8 keer hogere binding vertoonden, bleken regulatoren te zijn van de ontwikkeling, het behoud of de differentiatie van HSCs. Deze omvatten ondermeer SCL, RUNX1 en GATA2. Analyse van de expressie van genen wees uit dat HOXB4 werkt als een transcriptionele activator en repressor maar liever activeert. SCL, GATA2, TGFB1 en Sox4 vertoonden een hogere expressie en Gfi1 een lagere. Daarnaast werd gezien dat HOXB4 voornamelijk rond de transcription start site bindt en dus als promotor fungeert (52).

Als HOXB4-mESCs geanalyseerd worden op dag 6, 16 en 26 van hun differentiatie, bleken 1665, 3947 en 2068 genen een andere genexpressie te vertonen tussen de verschillende tijdstippen, waarvan respectievelijk 60.6, 51.4 en 41.1% een opregulatie vertoonden. Het verschil in genexpressie reflecteerde het fenotype van de ontwikkelende cellen, met een afname van de pluripotente genen zoals NANOG en OCT4 en een toename van de regulatoren van de vroege hematopoëse, zoals RUNX1 en TGFB1. De gebonden genen op verschillende tijdstippen bleken betrokken te zijn in verschillende biologische processen, zo was dit op dag 6 voornamelijk genen van belang in de vroege embryonale ontwikkeling en later meer genen betrokken in specifieke functies van het hematopoëtische systeem. Wanneer de gederiveerde cellen vergeleken werden met myeloïd-biased HSCs, bleek de genexpressie van opgereguleerde genen (in vergelijking met lymfoïd-biased HSCs) ervan gelijkaardig te zijn. Opgereguleerde genen in ly-HSCs, bleken in HOXB4-ESC gederiveerde cellen down gereguleerd te zijn en de meerderheid van deze genen werd door HOXB4 getarget (53).

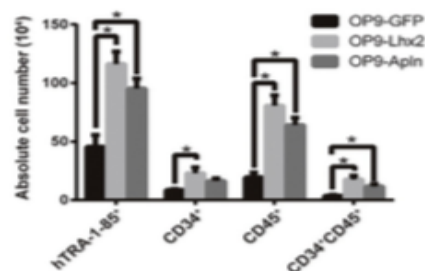
Hieruit kunnen we besluiten dat HOXB4 een belangrijke speler is in de regulatie van de hematopoëse, zowel in murine als humane setting. Uit de verschillende experimenten blijkt

dat de overexpressie van dit gen tot een significante toename in hematopoëtische activiteit kan leiden en dat het dit waarschijnlijk doet door mediëring van de micro-omgeving. HOXB4 werkt als een promotor voor vele genen en zorgt ervoor dat de resulterende cellen eerder kunnen omschreven worden als primitieve cellen en deze voornamelijk een myeloïde bias hebben en slechts een beperkt erythroïd differentiatiepotentieel.

5.5.2. Lhx2

Lhx2 is een LIM homeobox gen dat een belangrijke rol speelt in de ontwikkeling van de ogen, de voorhersenen of prosencephalon en definitieve erythrocyten (54). De silencing van dit gen leidt tot ernstige anemie en de geforceerde expressie ervan in HPs uit PSC of volwassen BM cellen zorgt voor de ex vivo expansie ervan, die SCF-afhankelijk zijn (54, 55)

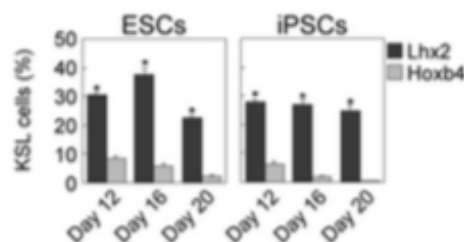
Kweken van humane ESCs in aanwezigheid van OP9 getransduceerd met Lhx2 (OP9-Lhx2), bleek voor een significant hoger aantal HPs (CD45+CD34+) en mature bloedcellen (CD45+CD34-) te zorgen, zonder een invloed uit te oefenen op het type CFU dat kon gevormd worden (CFU-GM, CFU-M en BFU-E). Overexpressie van Lhx2 zorgde er tevens voor dat zowel murine als humane PSCs teratoma's vormden in vivo die een hoger aantal HPs (CD48-CD150+ en CD38-CD34+ fractie respectievelijk) bevatten. Deze bleken echter niet in staat tot lange termijn repopulatie in secundaire ontvangers. Lhx2 zou zijn hematopoëtisch inductief effect deels te danken hebben aan een upregulatie van Apln. Dit gen is gekend als een promotor van de hematopoëtische differentiatie van hESCs. Het is een van de 35 genen die een veranderde expressie vertonen in OP9-Lhx2. De geforceerde expressie van enkel dit gen in OP9, gaf een verhoogde ratio CD34+ HPs die CFU-GM, CFU-G en BFU-E potentieel vertoonden (54).



Figuur 21. Aantal hematopoëtische cellen geproduceerd bij co-kweken van hESCs met OP9 cellen die Lhx2 tot expressie (OP9-Lhx2) of Apln tot expressie brengen (OP9-Apln) in vergelijking met niet-getransduceerde OP9 cellen (54).

Ook voor murine ESC, kon Lhx2 zorgen voor een toename in prolifererende HCs, die voornamelijk een immatuur fenotype vertoonden, gezien ze allemaal Lin- waren en voor 50% c-kit+ Sca-1 + (KSL) en 50% c-kit+ (KL). Daarnaast brachten zij GATA2 en C-MYC tot expressie. Lhx2-KL cellen vertoonden dezelfde samenstelling als BM-KL cellen, namelijk

HPCs, CMPs, GMPs en MEPs en produceerden een hoger aantal myeloïde en gemengde kolonies met verder succesvolle derivatie van erythrocyten, megakaryocyten en neutrofielen. Zowel primitieve als definitieve erythrocyten konden gedetecteerd worden maar aan een veel lagere frequentie dan in niet Lhx2-getransduceerde cellen. De bekomen HCs vertoonden in vivo potentieel. Na 16 weken was het BM-engraftment percentage 30% en deze cellen hadden CFU potentieel en LTR in secundaire ontvangers. Het BM bevatte naast cellen uit de myeloïde, erythroïde, megakaryocyte en B-cel lijn ook donor-gederiveerde KSL cellen. T-cellen waren niet detecteerbaar. Voor iPSC werden gelijkaardige resultaten gevonden, maar het chimerisme lag daar iets lager. Bij vergelijking van de efficiëntie van hematopoëtische inductie tussen HOXB4 en Lhx2, bleek onder gelijkaardige condities dat na 15 dagen, meer dan 50% van de cellen Lin⁺ waren bij gebruik van HOXB4 en bijna geen enkele cel Lin⁺ was bij gebruik van Lhx2. Het effect was niet synergistisch, gezien het aantal Lin⁻ cellen hoger lag bij gebruik van enkel Lhx2 in vergelijking met de combinatie van Lhx2 en HOXB4 (99% en 75.7%) (55).



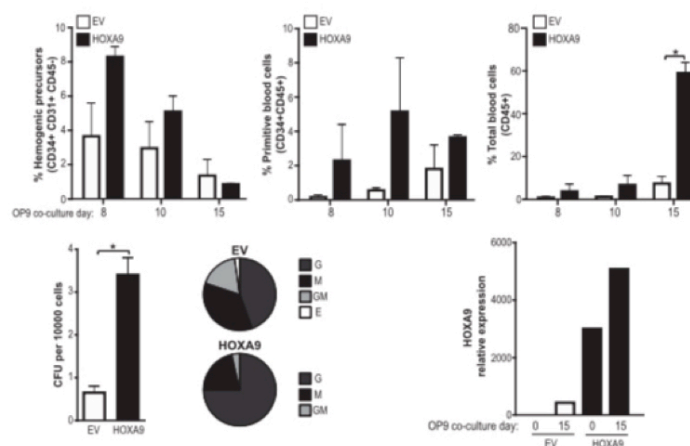
Figuur 22. Vergelijking van het percentage KSL cellen binnen de ESC of iPSC fractie in aanwezigheid van Lhx2 of HOXB4 op verschillende tijdstippen in de differentiatie (55).

Lhx2 is dus eveneens in staat tot versterking van de hematopoëtische differentiatie in murien en humane PSCs en doet dit deels door een opregulatie van Alpn. De volledige downstream regulatie van Lhx2 is echter nog niet volledig gekend. De geproduceerde cellen vertonen ook LTR in vivo en vertonen, in tegenstelling tot HOXB4, wel erythroïd potentieel maar geen T-cel potentieel. Bovendien produceren zij meer KSL cellen dan HOXB4 in dezelfde setting.

5.5.3. HOXA9

HOXA9 is een ander homeobox gen, uit de A cluster op chromosoom 7. Dit gen codeert opnieuw voor een transcriptiefactor die een rol speelt in de hematopoëse en leukogenese. HOXA9^{-/-} muizen zijn levensvatbaar maar hebben een minder volumineuze milt en thymus en lagere aantallen granulocyten, lymfocyten en HPs. Dubbel negatieve HSCs voor dit gen vertonen bovendien geen repopulatie-activiteit. De expressie ervan is hoog in definitieve CB-CD34⁺ cellen en laag in hESC-gederiveerde CD34⁺ cellen. Daarnaast zorgt de expressie ervan in BM-HSPCs voor een expansie van de HSCs en myeloïde precursors (56).

Bij spontane differentiatie van hESC, kwam HOXA9 tot expressie parallel aan het ontstaan van HE precursors (HEP) (CD45-CD31+) en nam terug af wanneer HEPs differentiatie ondergingen. Overexpressie in de hESCs zorde voor een hoger aantal HEPs (2 - 5x), primitieve bloedcellen (CD45+CD34+, 2 – 15x) en totale bloedcellen (CD45+, 2 – 8x). Binnen de HEP populatie, was er ook een vergrote proportie primitieve progenitors (CD41a+CD235a+, tot 12x). Bovendien lag het aantal kolonies 3 tot 5 keer hoger en deze hadden vooral een granulocyt fenotype. HOXA9 zou zijn functie uitoefenen door de mesodermvorming en vervolgens de HE vorming te induceren, gezien BRACHYURY en MIXL1 vroeg in de differentiatie opgereguleerd waren. Bij silencing van het gen, werd geen effect op pluripotentie of generatie van HEPs gezien, maar wel een minder efficiënte hematopoëtische differentiatie (2.5x minder CFU potentieel) en deze HCs gaven voornamelijk aanleiding tot CFU-GM en BFU-E. Dit is waarschijnlijk te wijten aan het behoud van de pluripotentie markers. Er werd geen in vivo engraftment of potentieel gevonden na intrahepatische transplantatie van HCs. Na gen-analyse bleken de meest opgereguleerde genen onder meer tot de categorie 'negatieve regulatie van proliferatie' te behoren, in lijn met de lichte daling van HEPs in cyclus bij HOXA9 overexpressie. De meest downgereguleerde genen speelden een rol bij de ontwikkeling van onder andere het skeletaal systeem, wat suggereert dat HOXA9 mogelijk werkt door inhibitie van alternatieve pathways. Een belangrijke opmerking is dat 8 van de 20 door HOXA9 geactiveerde regulatoren upstream deel uitmaken van de NFkB pathway en de regulatie van deze pathway is geassocieerd aan hESC differentiatie (56).



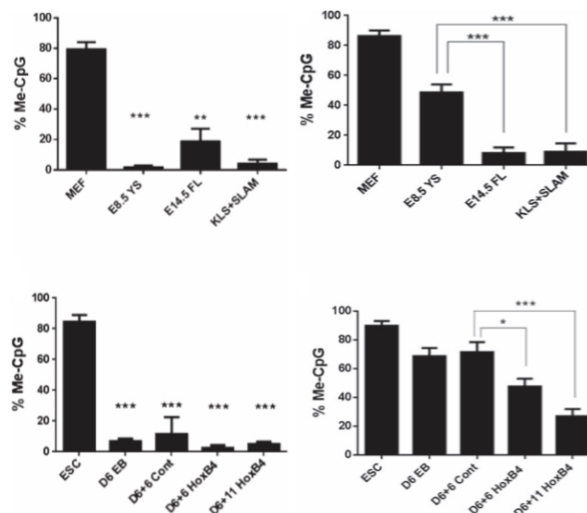
Figuur 23. Effect van HOXA9 overexpressie in hESC (56).

De expressie van HOXA9 tijdens de differentiatie van hESCs kan dus voor een hogere generatie van HCs zorgen en doet dit waarschijnlijk door de inhibitie van alternatieve pathways. Op die manier zorgt het voor een sterkere inductie van het mesoderm en HE vorming. De expressie van HOXA9 zorgt waarschijnlijk wel voor een minder efficiënt erythroïd ontwikkelingspotentieel.

5.5.4. RUNX1

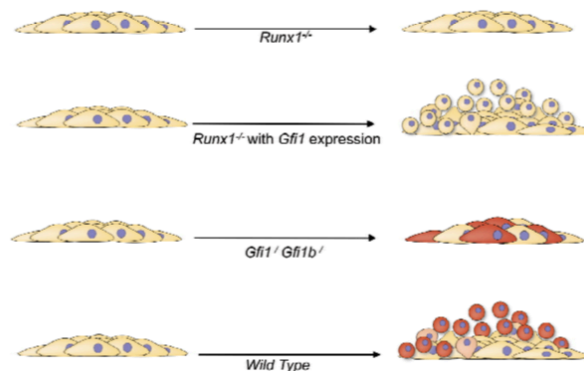
RUNX1 of AML1 is een gen dat behoort tot de RUNX familie, gekend als runt-gerelateerde transcriptiefactoren. Het fungeert als de alfa-subunit van het core-binding factor complex en is de meest voorkomende translocatie in acute myeloïde leukemie bij mensen. Knock-out van RUNX1 in embryo's van muizen, toont aan dat deze niet in staat zijn langer te leven dan 12.5 dagen gestatie met een volledig verlies van definitieve hematopoëse. (57-59)

De transcriptie van RUNX1 wordt gecontroleerd door 2 promotors (P1 en P2), die gereguleerd worden afhankelijk van de ontwikkelingsfase, en een intronisch enhancer element. De P1 promotor bleek een minder belangrijke rol te spelen tijdens de hematopoëtische differentiatie, gezien deze in alle stadia van hematopoëtische ontwikkeling een ongemethyleerde staat vertoonde. De enhancer vertoont een afname in methylatie tijdens de hematopoëtische differentiatie in mESCs en deze hypomethylatie bleek gecorreleerd te zijn aan het verwerven van een hematopoëtische identiteit, gezien c-kit+CD41+ cellen een lagere methylatie vertoonden dan hun CD41- tegenhanger. Voor de P1 promotor is geweten dat deze gecorreleerd is aan de definitieve hematopoëse, gezien dat specifieke mRNA dan is opgereguleerd en het grootste deel van het totale RUNX1 transcript beslaat. Zowel in vitro als in vivo nam de methylatie van deze promotor af met een verder ontwikkelingsstadium. Echter, wanneer HOXB4 tot overexpressie werd gebracht in deze cellen werd een grotere daling in P1 methylatie vastgesteld. HOXB4 doet dit door een directe binding met P1 aan te gaan en de de methylatie ervan te verminderen en het creëren van een permissieve chromatine status. De P1 hypomethylatie bleek ook te correleren met repopulatie-activiteit (57).



Figuur 24. Percentage van methylatie van de RUNX1 enhancer in vivo (links boven) en bij in vitro differentiatie van mESC op verschillende tijdstippen en in aan- of afwezigheid van HOXB4 (links onderaan). Percentage van methylatie van de P1 promotor in vivo (rechts boven) en bij in vitro differentiatie van mESC op verschillende tijdstippen en in aan- of afwezigheid van HOXB4 (rechts onderaan) (57).

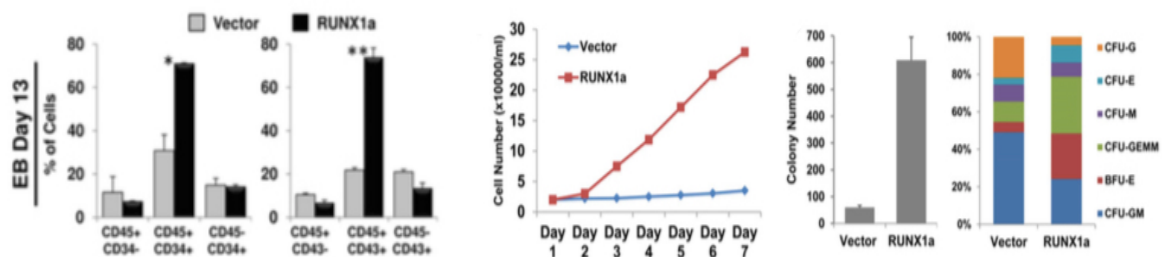
Gfi1 en Gfi1b werden geïdentificeerd als directe targets van RUNX1. Deze genen coderen voor nucleaire zinkvingers proteïnen die werken als transcriptionele repressoren. Zij vertonen een significant lagere expressie in afwezigheid van RUNX1 en zijn in staat de vorming van kolonies te herstellen in RUNX1^{-/-} FLK1⁺ cellen, maar in lagere aantallen dan wanneer RUNX1 zelf tot expressie wordt gebracht. In RUNX1^{+/-} cellen stijgt de expressie van deze genen progressief gedurende de eerste 2 dagen van hematopoëtische differentiatie, in overeenkomst met het verschijnen van HE. In RUNX1^{-/-} cellen houdt de hematopoëtische differentiatie halt op dat moment. Overexpressie van Gfi1 in dit HE zorgt voor de downregulatie van sommige endotheliale markers (TIE2 en CDH5) en de gelijktijdige opregulatie van vroege hematopoëtische markers (CD41). Echter, de bekomen cellen zijn niet in staat om hematopoëtische kolonies te vormen. De deletie van een van de genen individueel, leidt niet tot het fenotype zoals dat terug te vinden is in afwezigheid van RUNX1, gezien het ene gen kan compenseren voor verlies van het andere gen. Embryo's met silencing van beide genen (Gfi1^{-/-}/Gfi1b^{-/-}) stierven vroeger dan embryo's met silencing van een van de genen (Gfi1^{+/-}/Gfi1b^{-/-} of Gfi1^{-/-}/Gfi1b^{+/+}), waarschijnlijk te wijten aan een beperkte productie van mature RBCs. Bovendien konden deze Gfi1^{-/-}/Gfi1b^{-/-} cellen geen veranderingen in fenotype en morfologie ondergaan, nodig voor de disseminatie in de YS en het embryo. Zij behouden namelijk de expressie van endotheliale genen (zoals TIE2 en FLK1), maar zijn wel in staat hematopoëtische kolonies te vormen wanneer ze worden losgemaakt van hun oorspronkelijke cellaag. Zoals reeds hoger vermeld, worden hierbij geen RBCs gevormd maar wel myeloïde cellen zoals macrofagen (58).



Figuur 25. RUNX1 is nodig voor zowel de morfologische verandering als het verwerven van de hematopoëtische identiteit (cellen worden rood). Gfi1/Gfi1b zijn nodig voor de veranderingen in morfologie maar bijkomende, ongekekende, targets van RUNX1 zijn nodig het verkrijgen van hematopoëtisch potentieel (58).

RUNX1 heeft 3 isovormen, RUNX1a, RUNX1b en RUNX1c. B en c worden gereguleerd door de P2 en P1 promotor respectievelijk en vertonen een gelijkaardige functie. De a-vorm wordt tevens door de P2 promotor gereguleerd. De verschillende isovormen vertonen geen

functionele verschillen in murine HSPCs en silencing van de c-vorm heeft geen effect op de hematopoëtische ontwikkeling. Echter, de geforceerde expressie van de a-vorm in murine HCs versterkt de engraftment na transplantatie, wat een belangrijke rol voor deze isovorm suggereert. RUNX1a stuurde de differentiatie richting mesoderm (opregulatie van KDR en BRACHYURY) en versterkte de hemogene differentiatie (opregulatie van SCL en GATA2 en toename aantal CD31+CD34+). Op die manier werd een groter aantal HSPCs gevormd en de bekomen cellen bleken een myeloïde bias te hebben, gezien er significant meer CD33+ en minder CD11b+ cellen werden gedetecteerd. Er werd een hoger percentage aan CFU-E, CFU-GEMM en BFU-E kolonies gezien, wat een verhoogd potentieel voor RBC vorming suggereert en bijgevolg een versterkte definitieve hematopoëse. Na injectie van CD34+CD45+ cellen in muizen, bleek het chimerisme een niveau van 6 tot 15% te bereiken en deze vertoonden myeloid (CD33), B lymfoïd (CD19) en erythroïd (CD36) potentieel, 9 weken na transplantatie (59).



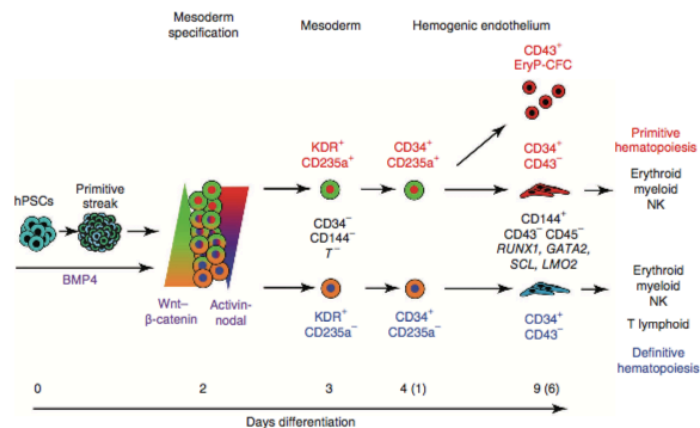
Figuur 26. Percentage van hematopoëtische cellen positief voor aangegeven oppervlakte marker (links), aantal gevormde cellen (midden) en CFU-potentieel (rechts) na RUNX1a overexpressie in vergelijking met een controle groep (59).

RUNX1 expressie is dus van belang voor het verwerven van cellen uit de definitieve hematopoëse en doet dit door de EHT te ondersteunen. De gegenereerde cellen vertonen enig in vivo potentieel maar T-cel potentieel ontbreekt ook hier. Uit de resultaten blijkt ook dat het een target is van HOXB4.

5.6. MANIPULATIE VAN PATHWAYS

CD235a zou niet alleen tot expressie komen op erythroïde cellen, maar ook vroeg in de ontwikkeling een expressie vertonen op cellen met een primitieve hematopoëtische identiteit. Het kwam op dag 3 voor het eerst tot expressie op FLK1+ mesoderm, 24u na het ontstaan van een BRACHYURY+ populatie. Op dat moment komen HE, hematopoëtische of endotheliale markers nog niet tot expressie. Inhibitie van de Activin/Nodal pathway tussen dag 2 en 3, wat noodzakelijk is voor de primitieve hematopoëse, belette het ontstaan van deze FLK1+CD235a+ populatie. Activatie ervan leidde tot een toename in de grootte van deze populatie. CD235a expressie kenmerkt dus primitieve HPs. De FLK1+CD235a+ populatie

genereerde bij verder kweken het grootste aantal CD34⁺ cellen in vergelijking met FLK1⁺/CD235a⁻ of FLK1⁻/CD235a⁻ cellen. Nog verder in de differentiatie genereerde de FLK1⁺/CD235a⁺ populatie het grootste aantal CD43⁺ cellen (70% vs 20%). Waarschijnlijk is deze CD43⁺ populatie dus de expansie van de primitieve hematopoëtische golf. Zowel de FLK1⁺/CD235a⁺ als de FLK1⁺/CD235a⁻ populatie gaf aanleiding tot een CD34⁺CD43⁻ populatie op dag 9, die beiden gelijkaardige aantallen burst-like erythroïde kolonies genereerden, verschillend van de CFU-A gederiveerde kolonies. Echter de FLK1⁺/CD235a⁻ gederiveerde kolonies vertoonden een hoger percentage globine geassocieerd met de definitieve hematopoëse. Beide populaties vertoonden ook NK potentieel maar enkel de FLK1⁺/CD235a⁻ gederiveerde populatie vertoonde ook T-cel potentieel. De CD34⁺ populatie van FLK1⁺/CD235a⁺ en FLK1⁺/CD235a⁻ populaties bevat dus progenitors van primitieve en definitieve hematopoëse, respectievelijk. Beide populaties gaan door een CD34⁺CD43⁻ HE populatie, die niet kan onderscheiden worden op basis van de nu reeds gekende oppervlaktemarkers. De inhibitie van Activin/Nodal pathway, heeft geen negatief effect op de de definitieve hematopoëtische ontwikkeling, wat suggereert dat hier andere factoren voor van belang zijn. De Wnt/beta-catenine (WNT/B) pathway speelt een rol in de regulatie van hematopoëse bij mESCs. Inhibitie van deze pathway in hESCs en hiPSCs leidde tot een 2-voudige toename in CD235a⁺ populatie terwijl activatie ervan de ontwikkeling van deze populatie inhibeerde. Inhibitie van deze pathway had geen effect op de primitieve hematopoëse gezien zowel de FLK1⁺/CD235a⁺ als de FLK1⁺/CD235a⁻ populatie aanleiding gaf tot een CD43⁺ populatie (90% en 40%). Ook de vroege inhibitie van deze pathway in de FLK1⁺/CD235a⁻ populatie blokkeerde definitief hematopoëtisch potentieel, gezien door gebrek aan T-cel potentieel. De auteurs suggereren bovendien een relatie tussen de AN en WNT/B pathway. Via simpele stadium specifieke manipulatie van de WNT/B pathway in EBs, is het mogelijk om ofwel primitieve ofwel definitieve HPs te genereren (33).



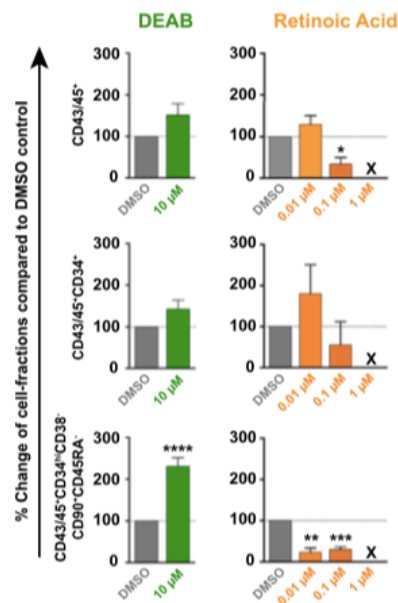
Figuur 27. Schematisch overzicht van de primitieve en definitieve hematopoëtische specificatie vanuit hPSCs (33).

5.7. GEBRUIK VAN KLEINE MOLECULEN

5.7.1. Retinoïnezuur

Retinoïnezuur (RA) is een signaalmolecule, afgeleid van vitamine A dat een rol speelt in celproliferatie en -differentiatie. Tijdens de embryogenese voorziet RA de signalen die nodig zijn voor het sturen van het lot van een niet-specifieke precursors naar een bepaald celttype (60).

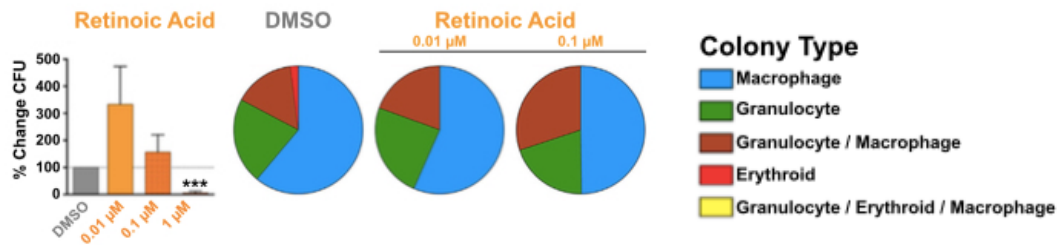
In humane ESC zorgde de inhibitie van RA signalisatie (RAi) voor een significante toename van de HSC-achtige fractie (gedefinieerd door CD45+CD34+CD38-CD90+CD45RA-), zonder verandering in het totaal aantal HCs. RA aan de hoogste concentratie zorgde voor een volledige onderbreking van de HC productie. Lagere concentraties RA konden de aanwezigheid van HPs wel herstellen, maar de HSC-like fractie bleef significant gereduceerd. RAi behoudt daarnaast ook het meer immature fenotype van de geproduceerde HPs, gezien door een vertraagde transitie van CD34+ naar CD34-CD38+ cellen in vergelijking met normale omstandigheden. De beperking van RA signalisatie tijdens PSC differentiatie verhoogt dus de productie van meer primitieve HCs (60).



Figuur 28. Percentage verandering in de aangegeven celfractie van cellen behandeld met een retinoïnezuur synthese inhibitor (DEAB, groen) of met retinoïnezuur (oranje) (60).

Het CFU potentieel na RA inhibitie lag 2.5 keer hoger en de kolonies vertoonden dezelfde distributie. Toevoeging van RA aan de hoogste concentratie leidde tot een volledig blok in CFU potentieel. RA aan lagere concentraties gaf hematopoëtische kolonies maar dit bereikte geen significantie. Dit is waarschijnlijk het gevolg van het hoger aantal mature progenitors (CD34+CD38+) ten nadele van de meer immature progenitors (CD34+CD38-), wat suggereert

dat RA de maturatie van HPs versterkt. Er werd in geen enkel experiment erythroïde kolonies aangetroffen (60).



Figuur 29. Percentage verandering in CFUs en de samenstelling ervan bij toevoeging van retinoïnezuur aan verschillende concentraties in vergelijking met de DMSO controle (60).

De lymfoïde differentiatie capaciteit van de HSC-like fractie die geproduceerd werd na RA inhibitie, was groter dan van de meer mature fractie (CD90-). Men stelde vast dat RAi vroeg in de ontwikkeling een toename van de commitment naar hematopoëtische lijn geeft. Dit volgt vanuit de observatie dat RAi gegeven tijdens de eerste 8 dagen van differentiatie een significant positief effect heeft op de HSC-like fractie en dat dit nog groter was indien de inhibitie gedurende 16 dagen verliep. Ook de frequentie van observatie van een mesodermale precursor, gedefinieerd als CD34+CD90+CD45/43-, bleek hoger te zijn na RAi en lager bij toevoeging van RA. Ook de genexpressie van BRACHYURY op dag 4 bleek hoger te zijn na RAi en er werd een afname in een cardiogene mesodermale marker vastgesteld op dag 8. Lage niveaus van RA zijn dus nodig voor de afname van commitment naar de niet-hematopoëtische lijn (60).

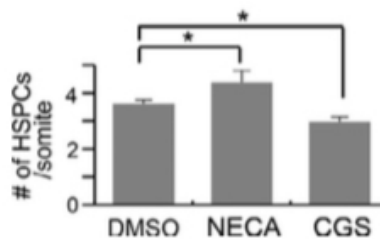
De inhibitie van retinoïnezuur signalisatie vroeg in de differentiatie van hESC zorgt dus voor de productie van een groter aantal HSPCs en deze hebben vooral een immatuur fenotype. Dit effect zou verklaard kunnen worden door een sterkere commitment van de hESCs naar het mesoderm, door de inhibitie van differentiatie naar niet-hematopoëtische lijnen.

5.7.2. Adenosine

Adenosine is een purine dat kan fungeren als een specifiek extracellulair signaalmolecule bij de regulatie van verschillende functies, zoals celproliferatie en -differentiatie. Het ontstaat na hydrolysisatie van ATP en de concentratie ervan stijgt bij zuurstof- of energienood. Het bindt op 4 G-proteïne gekoppelde receptoren (A1, A2a, A2b en A3). Een verhoging van de signalisatie ervan in volwassen muizen, vergroot de kolonievorming. Deze observaties suggereren een rol van adenosine signalisatie in de regulatie van HSCs (61).

In embryo's van de zebrafish zorgde de toevoeging van een adenosine agonist voor een dosisafhankelijke toename in het aantal RUNX1+ C-MYB+ HSPCs en dit was het meest potent

indien de agonist continu werd gegeven. De A2b receptor werd geïdentificeerd als een belangrijke speler in de HSC ontwikkeling. Tijdens de embryonale ontwikkeling komt deze receptor voornamelijk tot expressie op de vasculatuur in AGM en meer bepaald op FLK1+ cellen. De expressie op endotheliale cellen stijgt vlak voor het ontstaan van de circulatie en deze circulatie is nodig voor het behoud van de expressie van receptoren. Gebrek aan deze receptoren had geen effect op de algemene ontwikkeling van het embryo maar veroorzaakte een sterke reductie in aantal RUNX1+ C-MYB+ HSPCs, C-MYB+ MPP en rag1+ T cellen in de thymus (61).



Figuur 30. Aantal HSPCs per segment na toevoeging van een adenosine receptor agonist (NECA) en antagonist (CGS) (61).

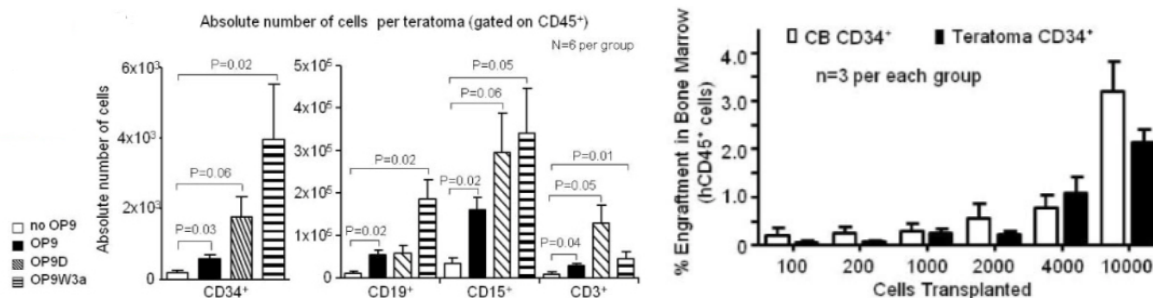
Voor muriene ESCs kon men eenzelfde rol vinden voor adenosine. De A2b receptor kwam voornamelijk tot expressie op VE-cadherine+ CD41- cellen, waaruit de HSCs ontstaan. Na toevoeging van een agonist, nam men een stijging waar in hematopoëtische kolonies (E, GM en GEMM), een opregulatie van hematopoëtische genen zoals SCL, RUNX1, GATA1 en betaglobine. Er werd echter een daling van de expressie van FLK1 gevonden, wat een antagonistisch effect van RUNX1 op Flk1 verder bevestigt. Eenzelfde toename in kolonievorming potentieel werd gevonden bij gebruik van een agonist op AGM explanten (61).

Adenosine bleek ook van belang te zijn tijdens EHT, gezien silencing van de A2b receptor eenzelfde effect had op EHT als RUNX1 silencing. De overexpressie van RUNX1 was in staat de HSPC vorming te herstellen. Adenosine bleek de HSPC vorming te mediëren door de regulatie van de hematopoëtische commitment van endotheliale cellen (61).

Promotie van adenosine signalisatie in muriene PSCs zorgt dus voor een dosisafhankelijke toename in hematopoëtische activiteit en doet dit door, na binding op de A2b receptor op delen van de AGM regio, de EHT te ondersteunen. Zo bekomt men een groter aantal HSPCs met een groter CFU-potentieel.

5.8. IN VIVO GENERATIE VAN HSCS VIA TERATOMA-VORMING

hiPSCs, gevormd uit keratinocyten, waren in staat in vivo teratoma's te vormen in muizen die BM-acthige structuren vertoonden met hierin verschillende bloedelementen, namelijk neutrofielen, lymfocyten, MK en HSPCs. Deze cellen waren in staat te migreren vanuit het BM naar het PB of lymfatisch systeem, gezien de CD45⁺ cellen en een kleiner aantal CD45⁺CD34⁺ cellen aan de randen van het teratoma konden gevonden worden. Op week 4 was 0.75% van de cellen CD45⁺ en op week 8 liep dit op tot 1.55%. Nadat verschillende OP9 cellijnen, die elk de vorming van verschillende HCs zouden ondersteunen, samen met de PSCs werden geïnjecteerd, gaf dit een sterkere hematopoëtische specificatie van de PSCs. Analyse 8 weken na injectie toonde een significante toename in aantal CD34⁺CD45⁺ cellen en CD15⁺ myeloïde cellen. Het aantal B en T-cellen was ook significant toegenomen bij co-injectie met OP9Wnt3a en OP9D, respectievelijk. Er werd een kleine populatie van CD45⁺ humane cellen gevonden in het beenmerg van de teratoma-dragende muizen en dit aantal nam toe bij co-injectie met OP9, OP9Wnt3a of OP9D. Voornamelijk HSPCs waren significant toegenomen bij co-injectie met OP3W3a en OP9D. CD15⁺ cellen waren sterk toegenomen in BM, milt en lymfeknopen bij co-injectie met OP9WNT3a en het aantal T-cellen in de milt bij co-injectie met OP9D. CD45⁺CD34⁺ cellen werden geïsoleerd en genereerden CFU-GM en CFU-M (0.5% tegenover 2.5% met CB cellen). De engraftment na transplantatie van deze cellen was vergelijkbaar met die van CB CD34⁺CD45⁺ cellen. Ze vertoonden een multilijn differentiatie met een predominantie voor de myeloïde lijn, terwijl dit bij CB cellen voor B-cellen is. De geproduceerde B-cellen produceerden gelijkaardige antilichamen als CB-HSPCs en de T-cellen konden cytokines produceren eens ze waren geactiveerd maar niet alle cytokines (62).



Figuur 31. Aantal cellen positief voor de aangegeven oppervlakte markers per teratoma, na injectie samen met verschillende OP9 cellijnen in vergelijking met geen co-injectie (links) en het percentage engraftment in het beenmerg na injectie van de CD34⁺ fractie geïsoleerd uit de teratoma's in vergelijking met CD34⁺ cellen uit navelstrengbloed (CB) (62).

Het is dus mogelijk HSPCs te vormen vanuit hiPSCs via in vivo teratoma vorming. Zij produceren naast myeloïde cellen ook lymfoïde cellen en dit wordt nog versterkt indien er OP9

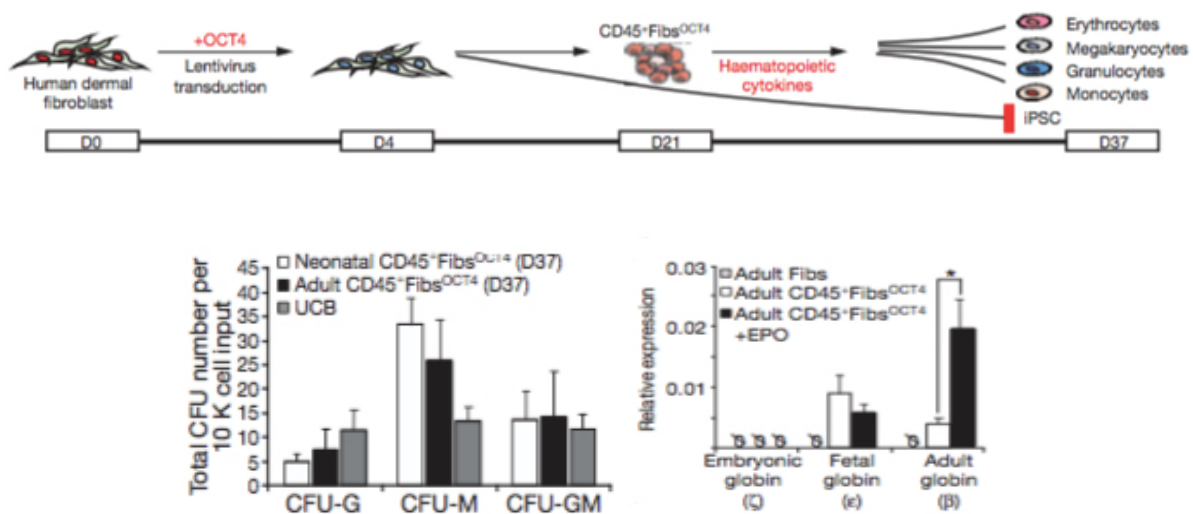
cellijnen, die de vorming van B en T cellen promoten, samen worden geïnjecteerd met de hiPSCs.

5.9. DIRECTE CONVERSIE

Via overexpressie van 5 TFs (ERG, GATA2, SCL, RUNX1c en LMO2) slaagde men erin een efficiënte reprogrammatie van murine embryonale fibroblasten (MEFs) en volwassen murine fibroblasten (MAFs) naar een hematopoëtisch lot te bekomen. De efficiëntie was echter consistent hoger voor MEFs dan voor MAFs. Op dag 21 waren de getransduceerde cellen c-kit, CD41, CD45, CD11b en TER119 positief en vertoonden zij erythroïd en myeloïd potentieel. IN MAFs bleken SCL, LMO2 en RUNX1c belangrijker dan ERG en GATA2 voor de productie van hematopoëtische kolonies, terwijl voor MEFs SCL en LMO2 voldoende waren, maar dit een lagere efficiëntie vertoonde. Met deze laatste 2 TFs werden geen hematopoëtische kolonies geobserveerd bij MAFs. Getransduceerde c-kit+ cellen bleken in staat te differentiëren in zowel myeloïde als erythroïde cellen, wat suggereert dat fibroblasten gereprogrammeerd werden naar het bloedprogramma, minstens gedeeltelijk, via een multipotente HP. Daarnaast werden tussen de getransduceerde cellen ook KSL+ cellen geobserveerd, waarvan sommigen CD48-CD150+ waren (fenotypische HSCs). 2 weken na injectie in murine ontvangers, werden deze cellen gedetecteerd in het PB en waren deze voornamelijk TER119+ RBCs. 8 weken na injectie bleek de engraftment echter niet op te lopen tot meer dan 1% in PB. De auteurs documenteerden ook dat p53-/- MEFs een meer efficiënte reprogrammatie vertoonden naar HPs, die erythroïd, myeloïd, MK en B en T lymfoïd potentieel hadden. Ze stelden tevens vast dat de reprogrammatie niet via een pluripotente staat verliep, gezien er geen pluripotentiemarkers konden geobserveerd worden, maar wel via een HE stadium. Ondanks dat er geen BrRACHYURY expressie kon gedetecteerd worden, vond men wel expressie van endotheliale genen en een vertraagde maar geleidelijke opregulatie van hematopoëtische genen. Bovendien bleken enkel CDH5+ en niet CDH5- cellen aanleiding te geven tot hematopoëtische kolonies (63).

Vanuit de waarneming dat tijdens reprogrammatie van humane fibroblasten (hFibs) naar iPSC, een deel van de gereprogrammeerde cellen een morfologie vertoonden gelijkaardig aan HCs (CD45+/Tra-1-60 – (iPSC marker)), en dat deze bovendien preferentieel OCT4 tot expressie brachten en een lage expressie van SOX2 en NANOG vertoonden, kon men Fibs direct reprogrammeren via OCT4 overexpressie. Fibs-OCT4 was, in tegenstelling tot SOX2-Fibs of NANOG-Fibs, in staat tot vorming van kolonies en dit was vergelijkbaar met iPSCs. Enkel deze gereprogrammeerde cellen gaven CD45+ cellen, die een toename in OCT4 expressie vertoonden en een lagere expressie van fibroblast genen. Behandeling met Flt3 en SCF vergrootte het aantal CD45+ kolonies met een factor 4 tot 6. De CD45+ cellen hadden cytokine

stimulatie nodig voor verdere hematopoëtische expansie en maturatie gezien doordat na stimulatie deze cellen CD45 behielden en positief werden voor myeloïd specifieke markers. Een kleine fractie was ook CD14+ (monocyten) en er werden ook granulocyte types geobserveerd. Zonder stimulatie was er wel behoud van CD45 maar werden geen specifieke lijnmarkers waargenomen. Ongeveer een kwart van de CD45+ cellen waren ook CD34+ en de CD45+ cellen gaven aanleiding tot CFU-vorming. De CD45+ vertoonden ook in vivo engraftment potentieel in primaire ontvangers tot 20%, vergelijkbaar met UCB- en gemobiliseerd PB-gederiveerde progenitors. De engraftte cellen waren voornamelijk van het myeloïde type (41% CD45+CD14+). Een deel van de engraftte cellen behield ook CFU-potentieel, vergelijkbaar met UCB. Er was echter een gelimiteerde engraftment in secundaire ontvangers. Ondanks de multilijn differentiatie capaciteit van CD45+ Fib-OCT4, werden geen erythroïde cellen gedetecteerd. Toevoeging van erythropoëtine zorgde wel voor een 2 voudige toename in CD71, samen met een toename in GlyA en volwassen, foetaal en embryonaal Hb. Het induceerde ook de MK-lijn. Er werd echter geen inductie naar lymfoïde lijn geobserveerd (64).



Figuur 32. Schematisch overzicht van de methode van directe conversie van humane dermale fibroblasten naar hematopoëtische cellen (boven), totaal aantal CFUs per 10 000 cellen bij gebruik van neonatale of volwassen fibroblast-gederiveerde iPSCs (Fib-iPSC) (links onder). Relatieve expressie van embryonaal, foetaal of volwassen globine voor en na gebruik van erythropoëtine (EPO) (64).

De directe reprogrammatie van humane dermale somatische cellen naar cellen uit de hematopoëtische lijn door overexpressie van bepaalde TFs is dus mogelijk. Dit gaat niet over een pluripotente staat en kan cellen met een myeloïde en een wisselende lymfoïde differentiatiecapaciteit produceren.

6. DISCUSSIE

Uit de resultaten blijkt dat de vorming van HSCs uit PSCs nog steeds moeilijk blijft. Verschillende hordes moeten overwonnen worden vooraleer men in staat is therapeutisch bruikbare HSCs te vormen.

Tot dusver slaagde men er nog niet in de omstandigheden zoals die in vivo aanwezig zijn, te recapitulieren in vitro. Verschillende inductiesystemen hebben wel hun nut bewezen voor de in vitro generatie van HSPCs. Zowel via EB vorming als via co-kweek systemen kan men de PSC laten differentiëren richting het hematopoëtische programma. Echter, de detectie van de HCs zoals die in het humane of muriene lichaam terug te vinden zijn, is niet consistent over de verschillende experimenten. De verschillende hematopoëtische niches waarin de embryonale hematopoëse plaatsvindt, lijkt nog te complex en de manier waarop deze niche de hematopoëse ondersteunt is nog niet volledig begrepen. Daarom is het moeilijk om deze niche en al de signalen die het voorziet in vitro na te bootsen. Een mogelijke oplossing is daarom het gebruik van preparaten uit deze niches als micro-omgeving, zoals AGM, BM of MSC. Deze niches geven een sterkere hematopoëtische inductie dan niches die vroeger in de ontwikkeling kunnen gevonden worden. Dit is aannemelijk gezien zij voornamelijk mature HSCs bevatten. Bij gebruik van delen uit het muriene lichaam (zoals feerder cellen) houdt dit echter het gevaar in van het gebruik van slecht omschreven factoren (47). Uiteraard kan dit een negatieve invloed betekenen voor de efficiëntie van HSPC-generatie, maar eventueel ook tot cellulaire transformatie leiden. Een welomschreven inductieprotocol zou dit kunnen omzeilen. Zowel voor humane als muriene PSCs kon men een inductiesysteem definiëren die een bewezen inductief hematopoëtisch effect heeft, maar hierbij werden opnieuw niet alle volwassen HCs gegenereerd.

Overexpressie van bepaalde genen, die van belang zijn in de normale hematopoëtische ontwikkeling, lijken belovende resultaten te tonen wat betreft hun hematopoëtisch inductiepotentieel. Hierbij moet toch de opmerking gemaakt worden dat de systemen die gebruikt worden om een gen tot overexpressie te brengen niet altijd even efficiënt zijn. Vaak wordt gebruik gemaakt van retrovirale transductie, maar de regulatie van de expressie van het gen is dan minder goed te controleren en kan ongewenste effecten geven. Gebruik van een tetracycline-induceerbaar systeem is eveneens moeilijk therapeutisch bruikbaar en het risico bestaat dat ongewenste genen worden getransduceerd, die eveneens tetracycline-afhankelijk zijn voor hun expressie en dit cellulaire transformatie kan bevorderen (48). Er moet dus op zoek gegaan worden naar een veilig en efficiënte manier van integratie en expressie van deze ectopische genen. Zowel overexpressie van HOXB4, Lhx2, HOXA9 en RUNX1 zorgen voor een bevordering van de hematopoëtische differentiatie, toch is de manier waarop dit gebeurt

nog niet volledig begrepen. De pathways waarin deze genen betrokken zijn, zijn nog onvoldoende gekend om hun in vivo expressiepatroon na te bootsen in vitro.

Naast de inductiesystemen, blijkt ook dat de keuze van het type PSC een belangrijke rol speelt. Verschillende ESC lijnen hebben een verschillend potentieel en efficiëntie van hematopoëtische differentiatie dat tijdens het differentiatieproces tot uiting komt. Theoretisch gezien zou men dus een efficiëntere generatie van HSPCs kunnen bekomen indien men gebruik maakt van de ESC lijnen die een hoog hematopoëtisch potentieel vertonen. In de praktijk kan het echter moeilijk zijn om dit op voorhand te bepalen. De vraag moet hierbij uiteraard gesteld worden of dit beïnvloed wordt door, niet-intentioneel, toedoen van de onderzoekers of dit wel degelijk inherent is aan de cellijn. Voor iPSCs is gebleken dat de keuze van startcel cruciaal is om na reprogrammatie een sterke hematopoëtische specificatie te bekomen. Cellen met een hematopoëtische identiteit zouden hiervoor zeer aantrekkelijk zijn omdat gebleken is dat zij een epigenetisch geheugen behouden dat ervoor zorgt dat ze na reprogrammatie makkelijker richting de cel van oorsprong differentiëren. Dit is vooral duidelijk bij gebruik van meer primitieve cellen als startcel en is aannemelijk gezien deze cellen minder ver in de differentiatiehiërarchie staan en dus beter een pluripotente staat benaderen. Over het algemeen zou het gebruik van iPSCs een aantrekkelijker methode zijn voor het produceren van HSPCs dan het gebruik van ESCs en dit omwille van verschillende redenen. Bij het proces van reprogrammatie worden eenderzijds duidelijk omschreven factoren gebruikt. Het is daarnaast makkelijk om somatische cellen te isoleren, ook voor hematopoëtische cellen. PB is namelijk makkelijk te verkrijgen en ook HSCs kunnen makkelijk geïsoleerd worden uit gemobiliseerd PB, UCB of BM. Bovendien is er nog het voordeel dat deze cellen patiënt-specifiek zijn en genetisch correctie kunnen ondergaan. In lijn hiermee zou het mogelijks nog interessanter zijn om somatische cellen meteen te reprogrammeren in het gewenste, hematopoëtische, celtype zonder over een staat van pluripotentie te gaan omdat de manier van inductie daar nog beter omschreven is. Ondanks dat dit voor andere lijnen reeds belovende resultaten toont, staat dit voor de hematopoëtische lijn nog in de kinderschoenen en werden bijgevolg weinig pogingen hiertoe ondernomen.

Hoewel uit verschillende methodes van differentiatie blijkt dat zij wel degelijk in staat zijn tot vorming van hematopoëtische cellen, blijft de algemene efficiëntie van generatie toch te laag om te voldoen aan de grote aantallen HSPCs, nodig voor HSCT. Bovendien zorgen de meeste inductiesystemen voor een myeloïde bias bij de productie van HCs. Gezien voor veel therapeutische toepassingen ook lymfoïde cellen nodig zijn, moet verder nagegaan worden op welke manier dit te verwezenlijken is. In sommige experimenten werden wel lymfoïde cellen gedetecteerd, doch hadden deze niet steeds de volledig functionaliteit van lymfoïde cellen uit

het volwassen lichaam. Het is bovendien zeer duidelijk geworden dat voornamelijk hematopoëtische cellen uit de primitieve golf gevormd worden en het moeilijk is HCs uit de definitieve golf te produceren. Dit kon in enige mate gestuurd worden door manipulatie van onder andere de Activin/Nodal pathway en Wnt/beta-catenine pathway, die de primitieve en definitieve hematopoëse ondersteunen respectievelijk. Toch is er een beter begrip nodig van de verschillen in signalen tussen het primitieve en definitieve programma om de differentiatie richting het gewenste programma te sturen.

De geproduceerde cellen worden in de meeste resultaten getest op hun potentieel via de CFU-assay. Hoewel dit zeker en vast een idee geeft over met welke cellen we te maken hebben, is dit slechts een benadering van hun in vivo potentieel. De omgeving waarin zij worden gebracht bij deze assay is niet volledig gelijk aan de in vivo omgeving, wat voor een verschillende activiteit in deze twee omgevingen kan zorgen. Ook het testen van de in vivo capaciteit via transplantatie in muriene ontvangers, houdt enkele beperkingen in. In vele onderzoeken wordt na transplantatie van de bekomen kandidaat-HSCs slechts een lage engraftment en beperkte repopulatie-activiteit vastgesteld. Ondanks dat deze transplantatie experimenten wel de HSCs functioneel identificeren, betekent dit toch een stress conditie voor de HSCs en het organisme. Het is aannemelijk dat ze omwille van die reden niet de functionele eigenschappen van homeostatische HSCs reflecteren (12). Daarnaast is de functionele reconstitutie afhankelijk van het gekozen transplantatiemodel. Eenderzijds is het duidelijk dat in de meeste experimenten voornamelijk primitieve progenitors en HCs worden gevormd. De transplantatie ervan in volwassen ontvangers, genereert een situatie waarin de immature cellen zich niet in hun natuurlijke niche bevinden. Wanneer ze in een meer leeftijd-gematchte donor worden getransplanteerd, kunnen ze eerst matureren en daarna een hogere engraftment en langere repopulatie capaciteit vertonen in volwassen ontvangers. Anderzijds moeten we de bedenking maken dat steeds muriene ontvangers gebruikt worden om het in vivo potentieel te testen. Echter, bij gebruik van humane cellen in muriene ontvangers kan het gedrag van deze cellen enorm verschillen van dit in een humane omgeving.

7. BESLUIT

Op slechts enkele jaren tijd werd een grote vooruitgang geboekt in het stamcelonderzoek. De verschillende pogingen die ondernomen werden om therapeutisch bruikbare HSCs te vormen uit PSC, hebben ons reeds vele nieuwe inzichten geboden omtrent de embryonale en volwassen hematopoëse. Echter, de generatie van HSCs, zoals die terug te vinden zijn in het volwassen humane beenmerg, is tot op heden nog niet verwezenlijkt. De grootste beperking is voornamelijk de generatie van cellen uit de primitieve golf met gebrek aan functionaliteit in het volwassen lichaam. Daarnaast is de efficiëntie van generatie van mogelijke HSCs te laag om te voldoen aan de noden voor HSC-transplantatie. Een andere struikelblok is de myeloïde bias die de meeste gevormde cellen dragen en bijgevolg hun beperkte capaciteit om alle functionele hematopoëtische cellen van het hematopoëtisch systeem te produceren. Verder onderzoek zal dus nodig zijn voor het volledig begrijpen van de hematopoëtische differentiatie, zodat deze in vitro kan gerecapituleerd worden. Op die manier kan een veilig en efficiënte manier van HSC-generatie uit PSCs tot stand komen die vertaald kan worden naar de therapeutische wereld.

8. REFERENTIES

1. Surani MA. In retrospect: Thirty-five years of endless cell potential. *Nature*. 2016;535(7613):502-3.
2. Ohtsuka S, Dalton S. Molecular and biological properties of pluripotent embryonic stem cells. *Gene Ther*. 2008;15(2):74-81.
3. Yu J, Thomson JA: Embryonic Stem Cells. Online 2016. Opgehaald op 11 augustus 2018, van https://stemcells.nih.gov/info/Regenerative_Medicine/2006Chapter1.htm.
4. Yu J, Thomson JA. Pluripotent stem cell lines. *Genes Dev*. 2008;22(15):1987-97.
5. Pauklin S, Pedersen RA, Vallier L. Mouse pluripotent stem cells at a glance. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 22):3727-32.
6. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, et al. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science*. 2007;318(5858):1917-20.
7. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76.
8. Scudellari M. How iPS cells changed the world. *Nature*. 2016;534(7607):310-2.
9. Zaehres H, Scholer HR. Induction of pluripotency: from mouse to human. *Cell*. 2007;131(5):834-5.
10. Cincinnati Children's: Induced Pluripotent Stem Cells (iPSCs). Online 2016. Opgehaald op 11 augustus 2018, van <https://www.cincinnatichildrens.org/research/cores/pluripotent-stem-cell-facility/ipsc>.
11. Bouhassira EE. Therapeutic potential of hematopoietic cells derived from pluripotent stem cells. *Expert Opin Biol Ther*. 2013;13(8):1099-102.
12. Rieger MA, Schroeder T. Hematopoiesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2012;4(12).
13. Golub R, Cumano A. Embryonic hematopoiesis. *Blood Cells Mol Dis*. 2013;51(4):226-31.
14. Ackermann M, Liebhaber S, Klusmann JH, Lachmann N. Lost in translation: pluripotent stem cell-derived hematopoiesis. *EMBO Mol Med*. 2015;7(11):1388-402.
15. Lacaud G, Kouskoff V. Hemangioblast, hemogenic endothelium, and primitive versus definitive hematopoiesis. *Exp Hematol*. 2017;49:19-24.
16. Kauts ML, Vink CS, Dzierzak E. Hematopoietic (stem) cell development - how divergent are the roads taken? *FEBS Lett*. 2016;590(22):3975-86.
17. Yoder MC. Inducing definitive hematopoiesis in a dish. *Nat Biotechnol*. 2014;32(6):539-41.
18. Cumano A, Godin I. Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu Rev Immunol*. 2007;25:745-85.
19. Orkin SH, Zon LI. Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008;132(4):631-44.
20. Lancrin C, Sroczynska P, Serrano AG, Gandillet A, Ferreras C, Kouskoff V, et al. Blood cell generation from the hemangioblast. *J Mol Med (Berl)*. 2010;88(2):167-72.
21. de Bruijn M. The hemangioblast revisited. *Blood*. 2014;124(16):2472-3.
22. Togarrati PP, Suknuntha K. Generation of mature hematopoietic cells from human pluripotent stem cells. *Int J Hematol*. 2012;95(6):617-23.
23. Xie X, Li Y, Pei X. From stem cells to red blood cells: how far away from the clinical application? *Sci China Life Sci*. 2014;57(6):581-5.
24. Vo LT, Daley GQ. De novo generation of HSCs from somatic and pluripotent stem cell sources. *Blood*. 2015;125(17):2641-8.
25. Lee J, Dykstra B, Sackstein R, Rossi DJ. Progress and obstacles towards generating hematopoietic stem cells from pluripotent stem cells. *Curr Opin Hematol*. 2015;22(4):317-23.
26. Daniel MG, Pereira CF, Lemischka IR, Moore KA. Making a Hematopoietic Stem Cell. *Trends Cell Biol*. 2016;26(3):202-14.
27. Liu S, Xu Y, Zhou Z, Feng B, Huang H. Progress and challenges in generating functional hematopoietic stem/progenitor cells from human pluripotent stem cells. *Cytotherapy*. 2015;17(4):344-58.
28. Hequet O. Hematopoietic stem and progenitor cell harvesting: technical advances and clinical utility. *J Blood Med*. 2015;6:55-67.
29. Ieda M. Direct reprogramming into desired cell types by defined factors. *Keio J Med*. 2013;62(3):74-82.
30. Lim WF, Inoue-Yokoo T, Tan KS, Lai MI, Sugiyama D. Hematopoietic cell differentiation from embryonic and induced pluripotent stem cells. *Stem Cell Res Ther*. 2013;4(3):71.

31. McKinney-Freeman SL, Naveiras O, Yates F, Loewer S, Philitas M, Curran M, et al. Surface antigen phenotypes of hematopoietic stem cells from embryos and murine embryonic stem cells. *Blood*. 2009;114(2):268-78.
32. Chang KH, Nelson AM, Fields PA, Hesson JL, Ulyanova T, Cao H, et al. Diverse hematopoietic potentials of five human embryonic stem cell lines. *Exp Cell Res*. 2008;314(16):2930-40.
33. Sturgeon CM, Ditadi A, Awong G, Kennedy M, Keller G. Wnt signaling controls the specification of definitive and primitive hematopoiesis from human pluripotent stem cells. *Nature biotechnology*. 2014;32(6):554-61.
34. Pfaff N, Lachmann N, Kohlscheen S, Sgodda M, Arauzo-Bravo MJ, Greber B, et al. Efficient hematopoietic redifferentiation of induced pluripotent stem cells derived from primitive murine bone marrow cells. *Stem Cells Dev*. 2012;21(5):689-701.
35. Kennedy M, Awong G, Sturgeon CM, Ditadi A, LaMotte-Mohs R, Zuniga-Pflucker JC, et al. T lymphocyte potential marks the emergence of definitive hematopoietic progenitors in human pluripotent stem cell differentiation cultures. *Cell Rep*. 2012;2(6):1722-35.
36. Medvinsky A, Rybtsov S, Taoudi S. Embryonic origin of the adult hematopoietic system: advances and questions. *Development*. 2011;138(6):1017-31.
37. Sarma NJ, Takeda A, Yaseen NR. Colony forming cell (CFC) assay for human hematopoietic cells. *J Vis Exp*. 2010(46).
38. Pearson S, Sroczynska P, Lacaud G, Kouskoff V. The stepwise specification of embryonic stem cells to hematopoietic fate is driven by sequential exposure to Bmp4, activin A, bFGF and VEGF. *Development*. 2008;135(8):1525-35.
39. Gori JL, Chandrasekaran D, Kowalski JP, Adair JE, Beard BC, D'Souza SL, et al. Efficient generation, purification, and expansion of CD34(+) hematopoietic progenitor cells from nonhuman primate-induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2012;120(13):e35-44.
40. Krassowska A, Gordon-Keylock S, Samuel K, Gilchrist D, Dzierzak E, Oostendorp R, et al. Promotion of haematopoietic activity in embryonic stem cells by the aorta-gonad-mesonephros microenvironment. *Exp Cell Res*. 2006;312(18):3595-603.
41. Ledran MH, Krassowska A, Armstrong L, Dimmick I, Renstrom J, Lang R, et al. Efficient hematopoietic differentiation of human embryonic stem cells on stromal cells derived from hematopoietic niches. *Cell stem cell*. 2008;3(1):85-98.
42. Vanikar AV, Mishra VV, Firoz A, Shah VR, Dave SD, Patel RD, et al. Successful generation of donor specific hematopoietic stem cell lines from co-cultured bone marrow with human embryonic stem cell line: a new methodology. *Transplant Proc*. 2007;39(3):658-61.
43. Zhao HP, Lu GX, Wang QR. Two conditional media promoting the differentiation murine embryonic stem cells into hematopoietic stem cells. *Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2007;32(1):63-8.
44. Ramos-Mejia V, Fernandez AF, Ayllon V, Real PJ, Bueno C, Anderson P, et al. Maintenance of human embryonic stem cells in mesenchymal stem cell-conditioned media augments hematopoietic specification. *Stem Cells Dev*. 2012;21(9):1549-58.
45. Narayan AD, Chase JL, Lewis RL, Tian X, Kaufman DS, Thomson JA, et al. Human embryonic stem cell-derived hematopoietic cells are capable of engrafting primary as well as secondary fetal sheep recipients. *Blood*. 2006;107(5):2180-3.
46. Phetfong J, Supokawej A, Wattanapanitch M, Kheolamai P, Y UP, Issaragrisil S. Cell type of origin influences iPSC generation and differentiation to cells of the hematoendothelial lineage. *Cell Tissue Res*. 2016;365(1):101-12.
47. Xu Y, Liu L, Zhang L, Fu S, Hu Y, Wang Y, et al. Efficient commitment to functional CD34+ progenitor cells from human bone marrow mesenchymal stem-cell-derived induced pluripotent stem cells. *PloS one*. 2012;7(4):e34321.
48. Tashiro K, Kawabata K, Omori M, Yamaguchi T, Sakurai F, Katayama K, et al. Promotion of hematopoietic differentiation from mouse induced pluripotent stem cells by transient HoxB4 transduction. *Stem Cell Res*. 2012;8(2):300-11.
49. Jackson M, Axton RA, Taylor AH, Wilson JA, Gordon-Keylock SA, Kokkaliaris KD, et al. HOXB4 can enhance the differentiation of embryonic stem cells by modulating the hematopoietic niche. *Stem Cells*. 2012;30(2):150-60.
50. Bowles KM, Vallier L, Smith JR, Alexander MR, Pedersen RA. HOXB4 overexpression promotes hematopoietic development by human embryonic stem cells. *Stem Cells*. 2006;24(5):1359-69.
51. Matsumoto K, Isagawa T, Nishimura T, Ogaeri T, Eto K, Miyazaki S, et al. Stepwise development of hematopoietic stem cells from embryonic stem cells. *PloS one*. 2009;4(3):e4820.

52. Oshima M, Endoh M, Endo TA, Toyoda T, Nakajima-Takagi Y, Sugiyama F, et al. Genome-wide analysis of target genes regulated by HoxB4 in hematopoietic stem and progenitor cells developing from embryonic stem cells. *Blood*. 2011;117(15):e142-50.
53. Fan R, Bonde S, Gao P, Sotomayor B, Chen C, Mouw T, et al. Dynamic HoxB4-regulatory network during embryonic stem cell differentiation to hematopoietic cells. *Blood*. 2012;119(19):e139-47.
54. Chen X, Zhao Q, Li C, Geng Y, Huang K, Zhang J, et al. OP9-Lhx2 stromal cells facilitate derivation of hematopoietic progenitors both in vitro and in vivo. *Stem Cell Res*. 2015;15(2):395-402.
55. Kitajima K, Minehata K, Sakimura K, Nakano T, Hara T. In vitro generation of HSC-like cells from murine ESCs/iPSCs by enforced expression of LIM-homeobox transcription factor Lhx2. *Blood*. 2011;117(14):3748-58.
56. Ramos-Mejia V, Navarro-Montero O, Ayllon V, Bueno C, Romero T, Real PJ, et al. HOXA9 promotes hematopoietic commitment of human embryonic stem cells. *Blood*. 2014;124(20):3065-75.
57. Webber BR, Iacovino M, Choi SH, Tolar J, Kyba M, Blazar BR. DNA methylation of Runx1 regulatory regions correlates with transition from primitive to definitive hematopoietic potential in vitro and in vivo. *Blood*. 2013;122(17):2978-86.
58. Lancrin C, Mazan M, Stefanska M, Patel R, Lichtinger M, Costa G, et al. GFI1 and GFI1B control the loss of endothelial identity of hemogenic endothelium during hematopoietic commitment. *Blood*. 2012;120(2):314-22.
59. Ran D, Shia WJ, Lo MC, Fan JB, Knorr DA, Ferrell PI, et al. RUNX1a enhances hematopoietic lineage commitment from human embryonic stem cells and inducible pluripotent stem cells. *Blood*. 2013;121(15):2882-90.
60. Ronn RE, Guibentif C, Moraghebi R, Chaves P, Saxena S, Garcia B, et al. Retinoic acid regulates hematopoietic development from human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports*. 2015;4(2):269-81.
61. Jing L, Tamplin OJ, Chen MJ, Deng Q, Patterson S, Kim PG, et al. Adenosine signaling promotes hematopoietic stem and progenitor cell emergence. *J Exp Med*. 2015;212(5):649-63.
62. Amabile G, Welner RS, Nombela-Arrieta C, D'Alise AM, Di Ruscio A, Ebraldidze AK, et al. In vivo generation of transplantable human hematopoietic cells from induced pluripotent stem cells. *Blood*. 2013;121(8):1255-64.
63. Batta K, Florkowska M, Kouskoff V, Lacaud G. Direct reprogramming of murine fibroblasts to hematopoietic progenitor cells. *Cell Rep*. 2014;9(5):1871-84.
64. Szabo E, Rampalli S, Risueno RM, Schnerch A, Mitchell R, Fiebig-Comyn A, et al. Direct conversion of human fibroblasts to multilineage blood progenitors. *Nature*. 2010;468(7323):521-6.