

MENS :
een indringende
en educatieve
visie op het
leefmilieu

Dossiers en rubrieken
didactisch gewikt
en gewogen door
eminente specialisten

MENS

Milieu-
Educatie,
Natuur &
Samenleving

31

4de kwartaal 1998 Driemaandelijks milieutijdschrift: 'een must voor een mens'

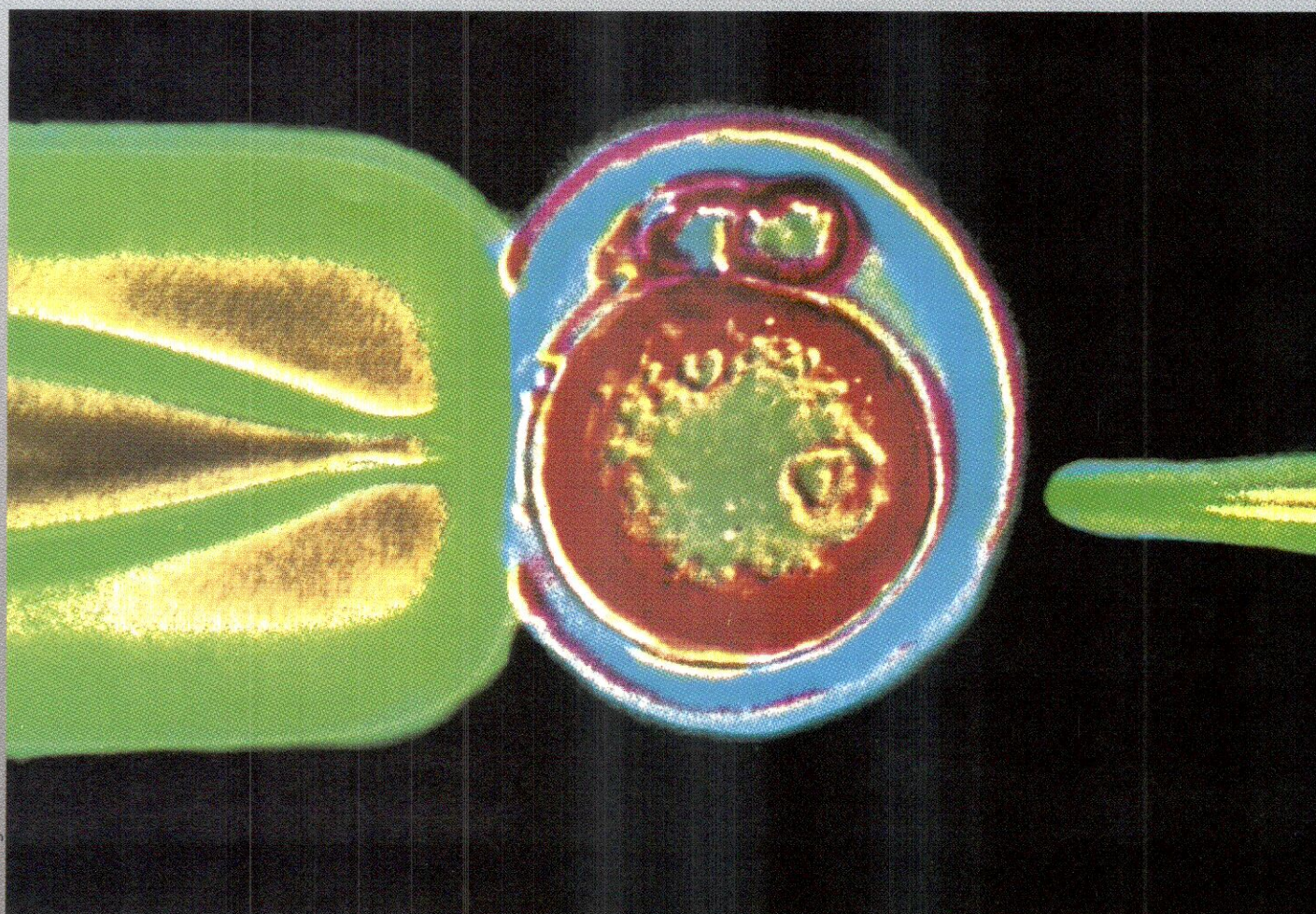


foto: Imagenetics

"Genezen met Gentechnologie"

Deel 1: Het Transgene Tijdperk



Inhoud

| | |
|---|----|
| Redactioneel: Genen in het dagelijkse leven | 2 |
| Dossier: "Genezen met Gentechnologie" | 3 |
| Vlaanderen: een traditie in biotechnologie | 16 |

Redactioneel

Een tijdje geleden raakte bekend dat wetenschappers erin slaagden chimere tussen mens en koe te creëren. Ze hadden de kern van een volwassen mensencel in een kernloze eicel van een koe gebracht, en vastgesteld dat het "embryo" zich begon te delen. Na enkele delingsrondes stierf het.

Het interessantste aspect van deze mededeling was niet dat wetenschappers poogden om genen van mens en koe te mengen, ongetwijfeld met nobele bedoelingen. Een klein deel van het genetisch materiaal wordt namelijk niet via het kern-DNA overgeërfd, maar langs de mitochondriën: celorganellen die uitsluitend door de moeder - in dit geval dus de koe - worden overgedragen.

Het interessantste aan de mededeling was dat de proeven al drie jaar geleden werden uitgevoerd, maar dat de uitvoerders ervan pas onlangs hun resultaten publiek durfden te maken. Ze maakten handig gebruik van de aandacht die het schaap Dolly, de vedette uit het kloningsonderzoek, opwoelde. Hun plotse openheid zal ongetwijfeld geïnspireerd zijn door de strijd rond de rechten op de kloningstechniek die is losgebarsten.

De wetenschap is het maatschappelijk debat ver vooruit. In de ondoorgroefde biotechnologische laboratoria met overal dezelfde apparaten en dezelfde proefbuizen kan niemand nog "zien" wat er aan de hand is. Er moest een beeld - in casu een schaap - voor de camera's gezet worden om de wereld te confronteren met het gegeven dat de techniek van het klonen binnen handbereik kwam.

Dolly was voor de wetenschap nuttig, omdat ze aantoonde dat klonen technisch mogelijk was. Maar de geestelijke, en vooral de financiële vaders van het dier waren eigenlijk op zoek naar methodes om de productie van leveranciers van biologische geneesmiddelen te stimuleren. Dolly en haar ongeslachtelijk gecreëerde lotgenoten moeten uiteindelijk leiden tot een batterij van dieren die in hun melk - of hun urine - stoffen afscheiden die ziekte en aftakeling van de mens tegengaan. Daartoe wordt de genetische informatie over een menselijk product in een dier gebracht. Als zo'n transgene ingreep succesvol is, kan het resultaat met de kloningsmethode in een biotechnologiebedrijf eindeloos gekopieerd worden om leefbare hoeveelheden van het middel op te leveren.

Dit streven zal het gegoochel met genen in de hand werken. Daarom is het wenselijk dat zoveel mogelijk mensen voldoende mondig zijn om het debat rond de genetische problematiek te versnellen. In die zin is het dossier dat "Mens" over transgenetica maakte een toe te juichen initiatief.

Dirk Draulans

© Alle rechten voorbehouden MENS 1998

Algemene informatie en coördinatie:

Roland Caubergs
RUCA, Groenenborgerlaan, 171 - 2020 Antwerpen
Tel.: 03/218.04.21 Fax: 03/218.04.17
e-mail: caubergs@ruca.ua.ac.be

Onder de auspiciën van:

- Vlaamse Vereniging voor Biologie (V.V.B.)
- Belgisch Werk tegen Kanker en Vlaamse Kankerliga
- Koninklijke Vlaamse Chemische Vereniging (K.V.C.V.)
- Koninklijke Vlaamse Ingenieursvereniging (KVIV)
- Vereniging Leraars Wetenschappen (VeLeWe)
- Vereniging voor het Onderwijs in de Biologie (V.O.B.)
- Vereniging Leraars Aardrijkskunde (V.L.A.)
- Vlaamse Ingenieurskamer (V.I.K.)
- Water - Energie - Leefmilieu (WEL)
- Centrum voor Milieusanering, U. Gent
- Verbond der Vlaamse Academics (V.V.A.)
- Nederlands Instituut voor Biologen (NIBI)
- Natuur & Wetenschap
- Provinciaal Instituut voor Milieu-Educatie (PIME)
- Koninklijke Maatschappij voor Dierkunde van Antwerpen (KMDA)
- Zoo Antwerpen en dierenpark Planckendael
- Koninklijk Belgisch Instituut voor Natuurwetenschappen (KBIN)
- Koninklijk Instituut voor het duurzaam beheer van de Natuurlijke rijkdommen en de bevordering van de schone Technologie (K.I.N.T.)

Kernredactie:

R. Caubergs, C. Thoen,
A. Van der Auweraert

Redactionele coördinatie:

A. Van der Auweraert, R. Caubergs

Medewerkers:

Dr. Ann Van Gysel (VIB)
Dr. Eric Strobbe (Amgen)
Prof. Dr. L. Schoonjans (Centrum voor transgene technologie, KUL)
Prof. Dr. M. Waer (Laboratorium voor experimentele transplantatie, KUL)
Prof. Dr. N. De Clerck (RUCA)
Prof. Dr. G. van der Groen (ITG, Antwerpen)
Dr. W. Luyten (Janssen Pharmaceutica)
Prof. Dr. P. Willems (Centrum Medische Genetica, UA)

Topic and fund raising:

Sonja De Nollin, Te Boelaarlei 23, 2140 Antwerpen
Tel.: 03 322 74 69, Fax 03 321 02 77,
e-mail: denollin@uia.ua.ac.be

Jaarabonnement door storting op naam van:

R. Caubergs, "Tijdschrift MENS":
België: 700 BF op 220-0851525-95

Verantwoordelijke uitgever:

R. Valcke (Vlaamse Vereniging voor Biologie)
Reimenhof 30, B-3530 Houthalen

Genezen met Gentechnologie

Deel 1: Het Transgene Tijdperk

Een aardappel eten kan de ziekte van de mens helpen. De biotechnologische ontwikkeling raakt salak en kousenheid. Het is niet alleen de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie, maar ook de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie. Het is niet alleen de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie, maar ook de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie.

Amerikaanse wetenschapper wil zichzelf klonen

De Amerikaanse wetenschapper Richard Seed (58) heeft een plan om zichzelf te klonen. Hij wil een kloon van zichzelf maken om de ziekte van de mens te genezen. Het is niet alleen de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie, maar ook de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie.

Genen redden het hart

Van de grootste uitdagingen op het gebied van hartziekten is de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie. Het is niet alleen de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie, maar ook de ziekte van de mens die kan worden genezen met gentechnologie.

Genetische manipulatie om DCE te ontwikkelen

Organen van Tro



Het bouwen van een hybride gen met daarin ingesplitst het structurele gen voor het rattengroeihormoon leidt tot overproductie van dit groeihormoon met de ontwikkeling van een reuzenmuis tot gevolg.

Geneeskunde van morgen

Wetenschappelijke vooruitgang wijzigt het uitzicht van onze samenleving en beïnvloedt onze leefgewoonten. Dit geldt zeker voor de biotechnologie die voor heel wat problemen originele en fascinerende oplossingen biedt. Ook in de gezondheidssector is biotechnologie niet meer weg te denken. Transgene dieren, klonen, erfelijke diagnostiek en gentherapie zijn onderwerpen die dagelijks het nieuws halen en alzo het wetenschappelijke denkpatroon bij mensen sterk beïnvloeden.

Door de gigantische hoeveelheid informatie wordt 'genezen met gentechnologie' gespreid over verschillende dossiers. Het eerste deel handelt over transgene (genetisch gemodificeerde) dieren en hun medische toepassingen. In een volgend nummer zal het accent voornamelijk liggen op de diagnose van (erfelijke) ziekten en gentherapie. Voor de wetenschappelijke en technische basisinformatie over genetische modificatie met een waaier aan toepassingen verwijzen we naar het dossier nr. 26 "gentechnologie op ons bord".

Waarom transgene dieren?

De mens maakt al sedert eeuwen gebruik van de natuurlijke eigenschappen van micro-organismen, planten en dieren om de kwaliteit van zijn leven te verbeteren. Met de moderne biotechnologie is het nu ook mogelijk organismen op een kunstmatige manier genetisch te veranderen, zodat ze nog functioneler worden voor de mens. Oorspronkelijk was de recombinant-DNA technologie vooral gericht op bacteriën met de bedoeling deze om te bouwen tot kleine fabrieken die in staat waren belangrijke (menselijke) eiwitten aan te maken, of hen nieuwe eigenschappen mee te geven waardoor ze hun vroegere taken nog beter konden invullen. Later is men ook schimmel- en gistcellen en zelfs cellen van zoogdieren gaan modificeren. En sinds enkele jaren is het ook mogelijk om genetisch gewijzigde dieren te creëren.

In 1982 zagen de eerste transgene muizen het daglicht. Zij beschikken over iets meer erfelijke informatie dan hun normale soortgenoten omdat een extra gen voor het rattengroeihormoon werd

ingebouwd. Het resultaat was een reuzenmuis. Hiermee werd aangetoond dat de technieken die eerder gebruikt werden om micro-organismen, cellen en planten te modificeren ook bij dieren werkten. Ondertussen is het nog nauwelijks mogelijk om transgene dieren weg te denken uit de geneeskunde of uit de wetenschap.

Waardevolle toepassingen van transgenese in hogere dieren zijn het fundamenteel onderzoek naar de functie van (menselijke) genen en het genereren van diermodellen voor (al of niet erfelijke) ziekten bij de mens. Zo heeft de ontwikkeling van transgene muizen met gemodificeerde oncogenen sterk bijgedragen tot het begrijpen van de rol van deze genen in het ontstaan van kanker. Andere diermodellen bestaan er ook voor auto-immuunziekten, sikkcelanemie, atherosclerose, de ziekte van Alzheimer, dermatitis en prostaatkanker waardoor wetenschappers steeds meer deze ziekteprocessen kunnen ontfaelen.

Steeds meer vinden biotechnologieën ook hun weg van universitaire

en RNA is zeer stabiel", bevestigt professor Jean-Jacques Cassiman van het Centrum voor Menselijke

knip- en plakwerk in de genen proberen te bereiken: men brengt via een virus een constructie van DNA

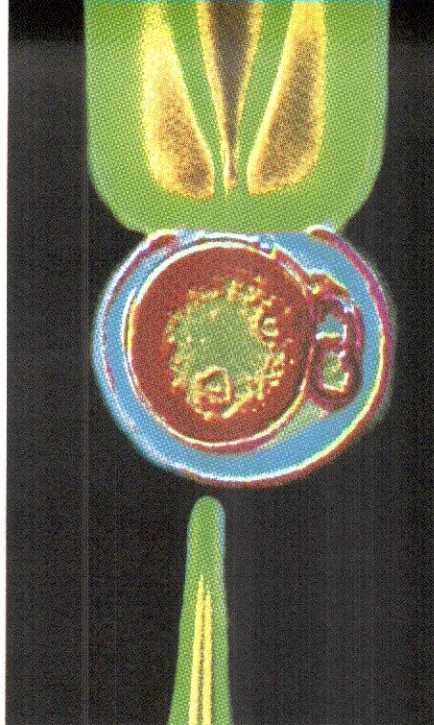
tingsverschillen organen productie doeleinde

laboratoria naar de industrie. Door het inschakelen van genetisch gemodificeerde dieren kunnen bepaalde geneesmiddelen en zelfs vervangingsorganen nu vlotter en in zuiverdere vorm gemaakt worden. Recombinant-DNA-technologie laat immers toe humaan DNA te introduceren in dieren, om deze tot een efficiënte, onuitputtelijke bron te maken van farmaceutische belangrijke eiwitten. Zo kan men reeds transgene landbouwdieren creëren die in hun melk menselijke eiwitten maken voor therapeutische doeleinden o.a. het menselijke lactoferrine, collageen, serumalbumine en zure alfa-glucosidase, alsook transgene varkens die organen leveren voor transplantatie. Andere toepassingen waaronder de productie van 'betere' landbouwuisdieren liggen ook in het verschiet. Men denkt bijvoorbeeld aan supervarkens en koeien met verhoogde melkproductie, magerder vlees of vlees dat meer water vasthoudt, vet van een gezondere samenstelling, verhoogde ziekteresistentie en stressbestendigheid, fijner gebeente, vissen die zich sneller voortplanten, kippen zonder scherpe snavels, enz... De mogelijkheden zijn enorm. De gezondheidssector is de sector waarin de biotechnologie tegenwoordig het grootste aantal toepassingen kent.

En toen kwam Dolly! Het eerste zoogdier dat gekloond werd uit een volwassen lichaamscel. Geweldig nieuws want nu volstaat het één transgeen dier te maken met de gewenste eigenschappen. Nadien kunnen dan zoveel kopieën gemaakt worden als men nodig heeft. Ook kan men zo bedreigde diersoorten misschien redden en het gebruik van proefdieren sterk reduceren.

De productie van transgene muizen via micro-injectie.

Een bevruchte eicel wordt met het gewenste gen geïnjecteerd en nadien ingeplant bij een schijnzwangere draagmoeder. Na de geboorte wordt uitgemaakt of het jonge dier het transgen al dan niet heeft opgenomen. Deze techniek vergt doorgaans zeer veel bevruchte eicellen en embryo's om tot een goed resultaat te leiden. Dit op zich sluit al uit dat de techniek ook bij mensen toegepast zou worden, afgezien nog van de ethische bezwaren.



Men kan vreemd DNA via een micro-injectie-naald rechtstreeks in de kern van een bevruchte eicel inspuiten.

Inbouwen van genen

Recombinant DNA wordt verkregen door het genetisch materiaal van verschillende bronnen (bv. menselijk en bacterieel DNA) te koppelen. Dat de bestaande grenzen tussen soorten en zelfs tussen de rijken van planten en dieren gemakkelijk te doorbreken zijn, is een direct gevolg van het universele karakter van de genetische code: een gen, zij het van een bacterie, een virus, een muis of een mens, zal aanleiding geven tot hetzelfde gecodeerde eiwit onafhankelijk van het organisme waarin het DNA tot expressie wordt gebracht. Na micro-organismen en planten kan men nu ook in hogere diersoorten vreemde genen inbrengen, wijzigen of uitschakelen.

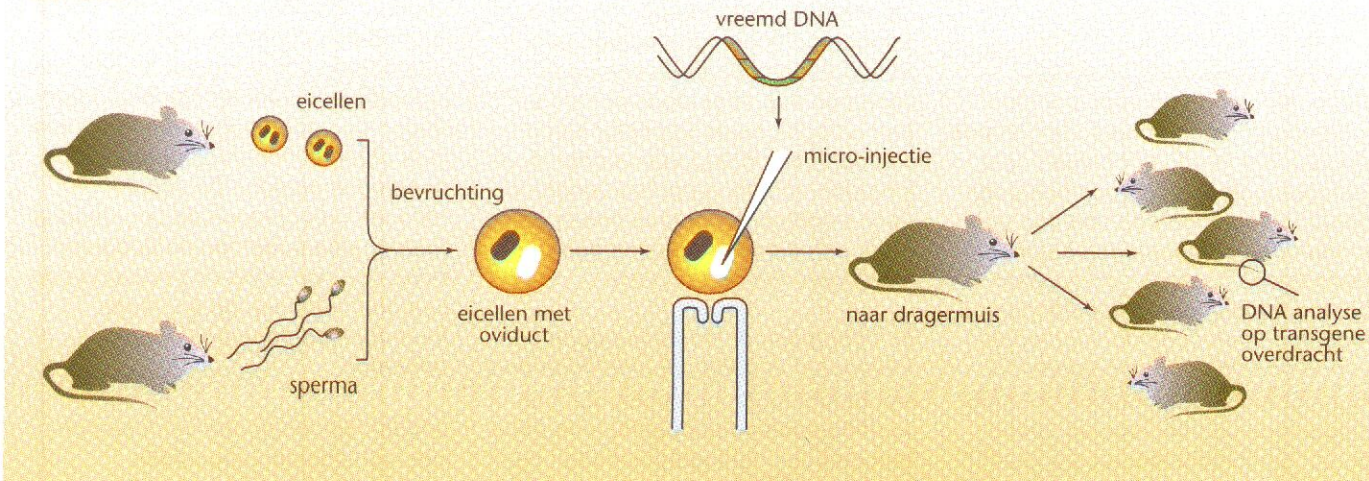
Om tot expressie te kunnen komen en overgeërfd te worden, moet het toegevoegde DNA worden ingebouwd in het erfelijk materiaal (de chromosomen) van het ontvangende organisme. Gedurende de afgelopen 10 jaar zijn hiervoor verschillende technieken ontwikkeld. Twee technieken die veelvuldig worden toegepast zijn micro-injectie (de klassieke transgenese) en het gebruik van embryonale stamcellen (tot nu toe enkel succesvol bij muizen). Recente verfijningen van deze technieken bieden radicaal nieuwe mogelijkheden in medisch onderzoek, diagnose en behandeling.

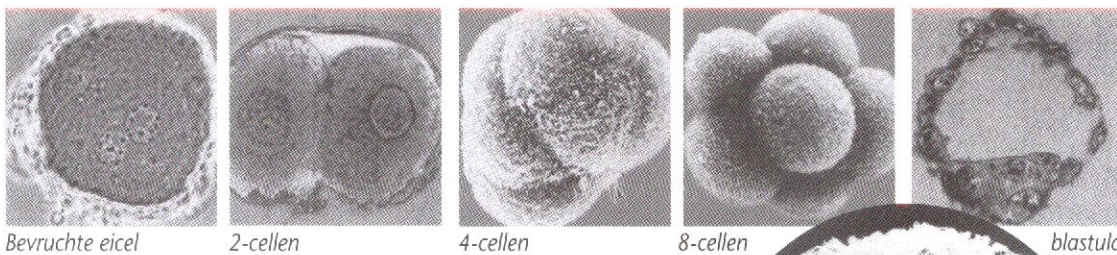
Klassieke transgenese

De meest directe manier om een vreemd gen in te brengen, is een gezuiverd stukje DNA gewoon in de celkern in te spuiten, in de hoop dat het daar in het genoom van de gastheercel wordt opgenomen. Merkwaardig genoeg werkt deze strategie en wordt toegepast bij klassieke transgenese waar het vreemde genetisch materiaal rechtstreeks in bevruchte eicellen wordt gebracht door middel van micro-injectie.

Laboratoriummuizen zijn de meest gebruikte dieren in het transgene onderzoek. Maar de techniek van micro-injectie laat ook toe andere dieren genetisch te modificeren waaronder landbouwdieren zoals varkens, konijnen, koeien, geiten en schapen.

Het maken van een transgene muis door middel van micro-injectie is relatief eenvoudig, zowel van opzet als van technische uitvoering.





Ontwikkelingsstadia bij een bevruchte eicel tot het blastulastadium. Dit is de fase in de pre-embryonale ontwikkeling waarin enkele tientallen cellen (die er op dat moment gevormd zijn) in twee groepen kunnen worden opgesplitst. Enerzijds is er de buitenlaag van cellen die een holte omsluiten en anderzijds is er binnenin een kleine celmassa (embryonale knop) waaruit later het eigenlijke organisme zich zal ontwikkelen.

Een DNA fragment wordt kort na de bevruchting met behulp van een micro-injectienaald in de kern (pronucleus) van een bevruchte eicel gebracht, zonder hierbij de cel blijvend te beschadigen. De meeste overleven die micro-injectie en bij 15 tot 30% van deze eicellen blijkt het DNA ingebouwd te worden in een chromosoom. Na de injectie worden de embryo's in vitro verder gekweekt gedurende enkele uren waarna de eicel zich begint te delen. In het 2-cellig stadium wordt het embryo door micro-chirurgische technieken terug ingeplant in de baarmoeder van een pseudo-zwangere draagstermuis. De transgene dieren worden op een normale wijze geboren na 19-20 dagen. Enige tijd na de geboorte worden de jonge muizen gescreend op de aanwezigheid van het transgen. Een positieve reactie identificeert een "founder"muis. Deze kan een stamvader of -moeder van een nieuwe transgene muizenstam worden. Nadien is nauwkeurig onderzoek van de uiterlijke kenmerken van de nakomelingen absoluut noodzakelijk om na te gaan of het vreemde gen correct wordt afgelezen.

stukjes DNA kan opnemen. Meestal gebeurt de integratie willekeurig maar in sommige gevallen gebeurt er een uitwisseling tussen het doelwitgen en het nieuwe gen.

Ook retrovirussen kunnen worden ingeschakeld om vreemde genen in een cel in te brengen. Retrovirussen stoppen namelijk van nature hun erfelijk materiaal tussen het DNA van de cellen die ze infecteren. Met de huidige technieken kunnen ze zodanig gewijzigd worden dat in principe elk soort nieuw gen in het retroviraal genoom kan worden ingebouwd. Dit is de reden waarom ze als voertuig (vector) kunnen dienst doen. Een nadeel echter is dat retrovirussen moeilijk te gebruiken zijn voor het insplitsen van grotere genen.

ES transgenese

Een andere zeer krachtige techniek bij transgenese van dieren maakt gebruik van embryonale stamcellen. Deze ES-cellen zijn afgeleid van de binnenste celmassa van een pre-embryo dat zich in het blastulastadium bevindt en kunnen nog tot alle soorten weefsels uitgroeien (ze worden daarom ook totipotent genoemd: tot alles in staat). Onder de juiste omstandigheden kunnen ES-cellen in het laboratorium gekweekt worden in petrischaaltjes en

allerlei vormen van genetische behandeling en selectie ondergaan.

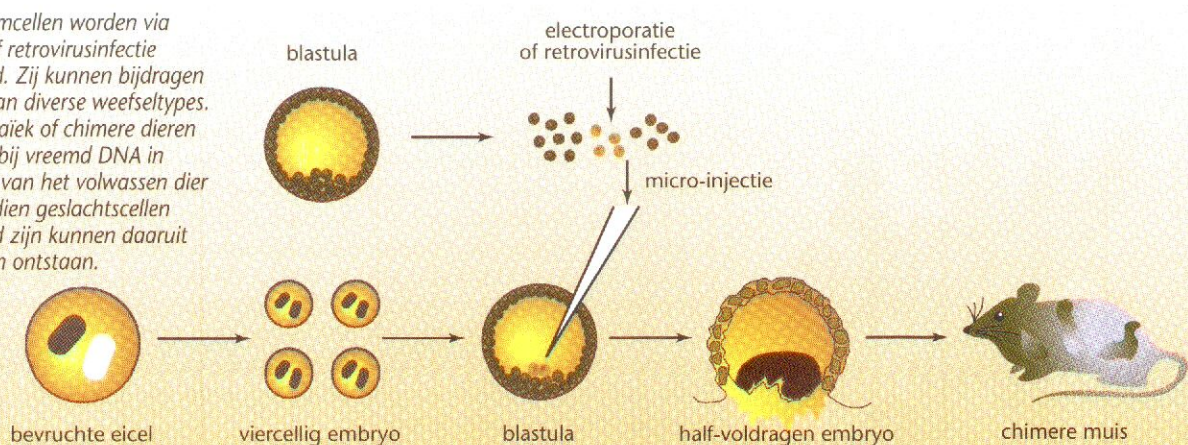
De mogelijkheden zijn veelzijdig. Een defect gen kan bijvoorbeeld vervangen worden door een intact gen (gentherapie) en ook omgekeerd. Het intacte gen wordt dan uitgeschakeld. Het gericht uitschakelen van genen (knock-out) is bijvoorbeeld één van de meest informatieve manieren om de functie van een gen vast te stellen. Door namelijk na te gaan wat er mis gaat, kan de normale functie van een gen soms achterhaald worden. Op dezelfde manier kan men ook ernstige erfelijke ziekten op een kunstmatige manier nabootsen en verkrijgt men een diermodel van deze ziekte.

Voorlopig is ES-cel transgenese enkel uitvoerbaar bij muizen. Veel onderzoek gaat momenteel naar het produceren van ES-cellen van andere dieren (zoals runderen, schapen en varkens). Het probleem dat zich hier stelt is dat de ES-cellen manipuleerbaar moeten zijn in vivo en hun totipotentie voor een lange periode moeten behouden. Tot nu toe is dit enkel gelukt met ES-cellen van muizen.

Alternatieve methoden

Een meer gerichte integratie van vreemd DNA in een cel bekomt men met de techniek van electroporatie. DNA met daarop het nieuwe gen wordt aan een kweek van cellen toegevoegd onder toediening van elektrische schokjes. Daardoor vallen er tijdelijk gaatjes in de celmembranen waardoor de cel de losse

Embryonale stamcellen worden via electroporatie of retrovirusinfectie getransformeerd. Zij kunnen bijdragen in de opbouw van diverse weefseltypen. Zo worden mozaïek of chimere dieren gekweekt, waarbij vreemd DNA in bepaalde cellen van het volwassen dier aanwezig is. Indien geslachtscellen getransformeerd zijn kunnen daaruit transgene dieren ontstaan.



De creatie van knock-out muizen

Het maken van knock-out muizen verloopt in twee stappen. Eerst worden de zogeheten chimere muizen gekweekt. Van een bevruchte eicel die men laat uitgroeien tot een blastula neemt men enkele embryonale stamcellen weg. Via electroporatie wordt het vreemde (geïnactiveerde) gen in de cellen ingebracht. De ES-cellen die het vreemde gen hebben opgenomen worden dan geselecteerd en door micro-injectie in een nieuwe blastula ingespoten. De transgene ES-cellen mengen zich met de cellen van de ontvangende blastula en in de verdere ontwikkeling van het embryo worden deze transgene ES-cellen een deel van de embryonale weefsels. De transgene muizen die hieruit ontstaan, hebben in een gedeelte van hun cellen een normaal gen en in een gedeelte het geïnactiveerde gen: men noemt deze muizen ook wel chimere muizen. In een tweede stap wordt dan met deze chimere muizen verder gekweekt tot er muizen geboren worden die het geïnactiveerde gen in al hun lichaamscellen hebben. Dit zijn de "knock-out" muizen.



"Chimaira", en andere mythologische monsters bestaande uit verschillende dierdonderdelen.

Een fragiele-X knock-out muis

Het fragiele X-syndroom houdt verband met een veel voorkomende erfelijke oorzaak van mentale achterstand. Ondanks het feit dat het gen verantwoordelijk voor het fragiele X-syndroom nl. het FMR1 gen reeds in 1991 werd ontdekt, is er momenteel slechts weinig geweten over de functie van het fragiele X eiwit. Om een beter inzicht te krijgen in de functie van het FMR1 gen en de mechanismen die een rol spelen bij de ontwikkeling van de afwijkingen van fragiele X patiënten, werd door onderzoekers een transgene muis ontwikkeld waarin het FMR1 gen werd geïnactiveerd. Net als mensen met het fragiele X-syndroom vormen deze muizen geen functioneel FMR1 eiwit en vertonen ze kenmerken die vergelijkbaar zijn met deze van menselijke fragiele X patiënten. Daarom kunnen deze muizen als model dienen om de functie van het FMR1 eiwit te achterhalen. De transgene muizen zijn ook een uitstekend model voor de studie van mentale achterstand en gedragsafwijkingen in het algemeen. In een later stadium kunnen ze zelfs gebruikt worden om geneesmiddelen of gentherapie voor het fragiele X syndroom te ontwikkelen. Ook andere neurologische aandoeningen waaronder de ziekte van Alzheimer worden op die manier bestudeerd.

De kankermuis

Onlangs ontdekte men dat bij meer dan de helft van de menselijke kankers in het gen dat voor het eiwit p53 codeert een fout aanwezig is. Blijkbaar kan de kanker (ongeremde celdelingen) zich pas ontwikkelen als het p53- gen werd beschadigd. Om de functie en de werking van dit gen te achterhalen schakelden onderzoekers het p53-gen in muizen uit. De transgene dieren ontwikkelden reeds op zeer jonge leeftijd kanker. Cellen van deze p53-deficiënte muizen kunnen in cultuur gebracht worden zodat hun eigenschappen kunnen worden bestudeerd. Deze en andere experimenten dragen bij tot het langzaam ontrafelen van de werking van het p53-eiwit. Zo weet men nu dat p53 de celdeling controleert en het ontwikkelen van tumoren tegengaat. Met deze kennis kan men dan verder de stap zetten naar een effectieve behandeling van kanker. Het inbrengen van het p53-gen in cellen waar dit gen defect is, behoort tot één van de mogelijkheden. Tumorcellen in een petrischaal worden inderdaad gestopt in hun groei wanneer het p53-gen wordt ingebracht (in een volgend dossier wordt uitgebreid op gentherapie ingegaan). In vivo is dit helaas nog niet succesvol genoeg doordat niet alle tumorcellen bereikt kunnen worden. De hoop van een aantal biotechnologiebedrijven is er dan ook op gericht om medicijnen te ontwikkelen die het gemuteerde p53-gen in alle lichaamscellen kunnen bereiken om zodoende de mutatie teniet te doen.

Zoals reeds eerder gezegd kan men met ES transgenese niet alleen genen uitschakelen maar ook genen veranderen, vervangen of bijvoegen. Bij vrijwel alle denkbare variaties blijft het basisprincipe behouden. De wijzigingen betreffen vooral de constructie van het recombinant DNA fragment dat men inbouwt. In geval men een mutatie wenst in een functioneel gen wordt in het DNA fragment de gepaste wijziging aangebracht. Of wanneer een muizengen door zijn menselijk equivalent dient te worden vervangen, wordt het menselijk gen ingebouwd tussen de flanken van het muizengen. Er dient uiteraard meer zorg te worden besteed aan het ontwerp en de kwaliteitscontrole van het DNA-construct vermits in beide gevallen een actief gen, en dus de expressie van een eiwit, moet worden verkregen.



Transgene dieren als levende bioreactoren

Met behulp van de recombinant-DNA technologie kunnen naast micro-organismen en planten ook dieren omgevormd worden tot uiterst efficiënte farmacologische productie-eenheden. Bacteriën waren de eerste organismen die genetisch gewijzigd werden om menselijke eiwitten te maken o.a. insuline en interferon. Snel bleek dat bacteriën niet altijd de beste keuze zijn. Bacteriën hebben soms een te beperkte mogelijkheid om genen, die complexe eiwitten coderen, via hun eenvoudig transcriptiesysteem te vertalen. Daarom werd sinds de jaren tachtig de aandacht verlegd naar gisten en zoogdiercellen die dichter bij de mens staan. Thans kan in principe elke cel, van welk organisme dan ook, genetisch gemodificeerd worden om therapeutische eiwitten te produceren. Zo maken genetisch gemodificeerde gistcellen een vaccin tegen hepatitis-B. Voor nog complexere eiwitten schakelt men zoogdiercellen in maar dit is een dure aangelegenheid. Zoogdiercellen zijn lastig te kweken en hebben in vergelijking met gisten een lage groeisnelheid. Enkel uiterst waardevolle producten komen voor deze productiewijze in aanmerking. Het polio vaccin wordt bijvoorbeeld op deze manier bereid, alsook erythropoïetine (EPO), een hormoon dat de productie van rode bloedlichaampjes regelt of bèta-interferon dat nu bij patiënten met multiple sclerose wordt gebruikt. Doorgaans kan uit bioreactoren enkele milligram eiwitten per liter vloeistof worden gewonnen.



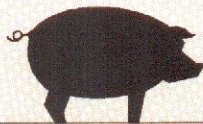

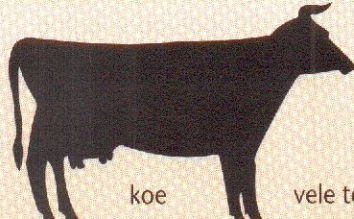
Veel onderzoek en experimenten worden momenteel uitgevoerd met transgenese van boerderijdieren zoals

koeien, schapen, geiten, konijnen en varkens. De dieren krijgen in al hun lichaamscellen één of meer humane genen ingesplitst. De productie van de gewenste eiwitten moet echter niet in alle cellen van het lichaam plaatsvinden. Het is voldoende dat ze enkel in bepaalde weefsels van de dieren tot expressie komen. Daartoe wordt aan het ingelaste gen een promotor gehecht, een kort stuk DNA, dat ervoor zorgt dat een gen alleen in welbepaalde cellen actief kan worden. Het weefsel dat hiervoor het best in aanmerking komt is melkklierweefsel, maar ook bloed en eiwit van eieren behoren tot de mogelijkheden. Een ongetwijfeld zeer futuristische toepassing is gevonden in genetische controlesystemen met een induceerbare promotor waardoor het gen naar willekeur aan en afgezet kan worden. Door bepaalde externe prikkels (koude, stress, licht, hormonen, farmaca, voeding) wordt de promotor geactiveerd en pas dan wordt het gewenste eiwit aangemaakt.

In 1991 werden tegelijkertijd drie rapporten gepubliceerd die een doorbraak betekenden in het gebruik van boerderijdieren als bioproducenten van geneesmiddelen. De onderzoeken rapporteerden de aanmaak van alfa-1-antitrypsine in schapen, humaan weefselplasminogeen (tPa) activator in geiten en humane lactoferrine in koeien. De productie van therapeutische eiwitten in de melk van dieren heeft een aantal voordelen o.a. de kwantiteit van de productie (in melk kunnen grote hoeveelheden aangemaakt worden), de frequentie van aanmaak, het geïsoleerd zijn van de melk van ander weefsel waardoor het extra eiwit geen invloed uitoefent op de andere weefsels en het verlaagde risico op aanwezigheid van infectieuze bestanddelen zoals deze die AIDS en hepatitis veroorzaken, in

vergelijking met menselijk bloed. Een bijkomend voordeel is de schaal waarop nu gewerkt kan worden. Een kudde van 10 transgene koeien bijvoorbeeld voldoet voor de productie van het eiwit factor IX voor de bloedstolling om de behoefte te dekken van hemofiliepatiënten in gans de wereld.

Productie van recombinante proteïnen in de melk van transgene zoogdieren

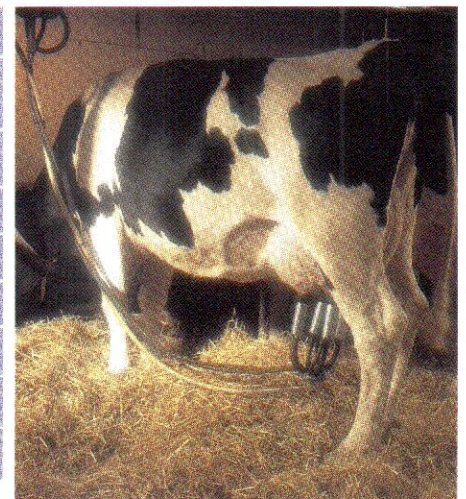
| | | g/jaar |
|---|--------|-------------|
|  | muis | tot 1g |
|  | konijn | 1kg |
|  | varken | 1-1000kg |
|  | schaap | 1-1000kg |
|  | koe | vele tonnen |

Muizen zijn weinig productief in vergelijking met andere zoogdieren. Daartegenover staat dat men met muizengenen efficiënte genconstructen kan maken. Koeien leveren dan wel veel op, bijvoorbeeld 4000 ton humaan albumine, maar de transgenese van koeien is een moeilijke en dure procedure. Het is daarom belangrijk dat eens het gewenste transgeen dier is gecreëerd, met behulp van kloontechnieken identieke nakomelingen kunnen gemaakt worden.

De verschillende systemen voor de productie van recombinante proteïnen

| | productie gehalte | extractiemogelijkheden van complexe eiwitten | aanmaak van complexe eiwitten |
|-------------------|----------------------|---|----------------------------------|
| Bacteriën | ++++ | ++ | + |
| Gisten | ++++ | +++ | ++ |
| Schimmels | ++++ | +++ | ++ |
| Transgene planten | ++++ | ++? | ++ |
| Baculovirus | ++++ | +++ | +++ |
| Zoogdiercellen | + | ++++ | ++++ |
| Transgene dieren | ++++ | ++++ | ++++ |

Elk van de bruikbare systemen heeft voordelen en nadelen op basis van de beschouwde factoren, transgene dieren scoren het beste.



En de realiteit...

De creatie van een transgeen dier is nu nog erg duur omwille van de zeer lage efficiëntie van de techniek van micro-injectie. Het percentage voor een geslaagde integratie van vreemde genen is bij laboratoriumdieren ongeveer 3% en bij landbouwdieren slechts 1%. Bij runderen is het nog minder. Slechts 15% van de geïnjecteerde bevruchte eicellen ontwikkelen tot een meercellig stadium (blastula of morula) en slechts 18% hiervan groeien uit tot een transgeen dier. Dit betekent dat meer dan 1000 bevruchte eicellen moeten geïnjecteerd worden voor elk transgeen kalf. En al slaagt men uiteindelijk in de creatie van het transgene dier, dan is het nog niet zeker dat het gen correct tot expressie zal komen. Gemiddeld gebeurt dit maar bij 50% van de dieren. Men weet nog niet goed waardoor dit wordt veroorzaakt. De omgeving waarin het gen terecht komt, heeft blijkbaar een belangrijke invloed op de expressie van het gen.

Een heleboel geld gaat ook naar het uiteindelijk testen van de transgene dieren. Men heeft echter goede hoop dat het gebruik van transgene dieren in de toekomst goedkoper zal zijn dan de dure kweek van zoogdiercellen.

Behalve de prijs belemmert ook de gebrekkige genenkennis het fokken van transgene dieren. Daar komt stilaan wel verandering in door de toepassing van genenkaarten (zie hiervoor het volgende nummer) om genen te identificeren die voor een bepaalde eigenschap coderen. Om genetische modificatie zinvol toe te passen is deze informatie onontbeerlijk.

Een alternatief voor de dure transgene dieren wordt geleverd door het gebruik van transgene planten als bron voor menselijke eiwitten. Het hepatitis-B-oppervlakte-antigen werd in 1992 op deze manier geproduceerd.

Het interessante aan planten is dat ze op grote schaal, op een eenvoudige manier en zonder gevaar voor infecties met menselijke pathogenen of ziekteverwekkers kunnen aangemaakt worden. Humaan albumine en hemoglobine zijn bijvoorbeeld goede kandidaten.

Aardappel wordt eetbaar vaccin

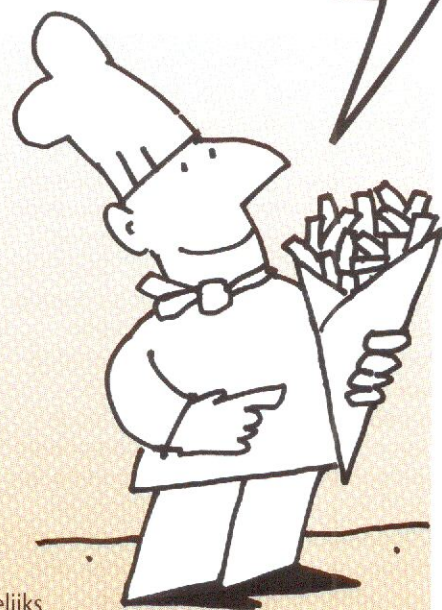
Als het aan de biotechnologen ligt krijgen we straks onze vaccins binnen via onze groenten en fruit.

De biochemische machinerie van plantencellen staat dichterbij ons dan die van bacteriën, wat betekent dat planten complexere menselijke eiwitten kunnen maken, iets waar bacteriën de werktuigen niet voor hebben. Planten hebben nog andere dingen voor op bacteriën of zoogdiercellen: ze zijn bijvoorbeeld te kweken zonder industriële installaties; meer dan wat grond en water is er niet nodig. En de planten kunnen gekweekt worden door de plaatselijke bevolking op plaatsen waar vaccinatieploegen nu nauwelijks kunnen komen.

Het vaccin moet bovendien niet meer uit de cellen worden gewonnen en dan in een inneembare vorm worden gebracht, het kan met plant en al verorberd worden.

Amerikaanse gentechnologen maakten een aardappel die bruikbaar is als vaccin tegen cholera. Cholera is een extreme vorm van diarree, die zonder behandeling bijna altijd eindigt in totale uitdroging en de dood. Jaarlijks sterven tweehonderd-duizend mensen aan deze ziekte. Onderzoekers splitsten in het DNA van een aardappel een gen in dat codeert voor een stukje van de gifmolecule choleratoxine-A. Het stukje van de gifmolecule was op zichzelf niet giftig, maar werd nog wel door ons afweersysteem herkend als "lichaamsvreemd en te vernietigen". Blijkbaar helpen de plantencellen het stukje gif doorheen de maag, waarna het in de darm de afweer tegen cholera kan opjutten. Rechtstreeks toedienen van hetzelfde deel van de gifmolecule roept nauwelijks afweer op omdat het door maagzuur afgebroken wordt. Er wordt ook aan andere ziekten gewerkt o.a. difterie, tetanus en hepatitis-B. Andere onderzoekers kijken of er iets te bereiken valt met bananen. Die hebben het voordeel dat ook jonge zuigelingen er reeds van kunnen eten en dat ze van nature in rauwe vorm genuttigd worden. Het zit er dus in dat in de toekomst vaccinplanten als aanvulling of als vervanging kunnen dienen voor de op klassieke manier geproduceerde vaccins.

ne grote of ne k
mè curry of may
mè insuline of int
een beetje zo
wat epo?



Vergelijking van de transgene opbrengst bij verschillende species

| | aantal embryo's per superovulatie | geslaagde zwangerschap | geboorten % | transgene dieren % van de geboorten | aantal transgene vrouwelijke dieren | maanden voor de productie van F2 dieren |
|--------|--------------------------------------|---------------------------|----------------|--|--|--|
| muis | 15 | 50 | 10-20 | 15 | 10 | 7,5 |
| konijn | 20 | 50 | 10 | 10 | 15 | 17 |
| schaap | 4 | 40 | 15 | 5 | 40 | 52 |
| varken | 15 | 40 | 5-8 | 10 | 20 | 38 |
| koe | 5 | 20 | 10 | 5 | 40 | 100 |

eine,
naise,
rferon,
t of

Recombinante geneesmiddelen

De laatste jaren nam het aantal geneesmiddelen die geproduceerd werden met moderne biotechnologie gestaag toe o.a. erythropoïetine, insuline, groeihormoon, stollingsfactor VIII, plasminogeen activatoren, hepatitis-B vaccin, interleukine en interferon. Veel van deze eiwitten zijn stoffen die in menselijk plasma circuleren. Vele belangrijke ziekten worden veroorzaakt door een gebrek aan deze eiwitten. Diabetes, groeistoornissen ten gevolge van groeihormoondeficiëntie en hemofilie kunnen worden behandeld door de patiënt deze ontbrekende eiwitten toe te dienen. De klassieke bereidingswijze van dergelijke producten is isolatie uit "natuurlijke" grondstoffen zoals bloed, urine of organen. Deze bronnen zijn echter beperkt en moeilijk controleerbaar. Ook is men zich de laatste jaren bewust geworden van het feit dat toediening van plasma-extracten het risico inhoudt op overdracht van infecties zoals HIV en hepatitis-B.

Hieronder volgt een korte bespreking van reeds bestaande recombinante geneesmiddelen geproduceerd door micro-organismen, planten of dieren.

Hormonen

De eerste biotechnologische producten op de markt waren recombinante (bacteriële) versies van humaan insuline (1982) en het humaan groeihormoon (1985).

Meer recent werden nog andere recombinante hormonen ontwikkeld o.a. het FSH, follikel stimulerend hormoon, dat gebruikt wordt voor ovariële stimulatie en bij in-vitro fertilisatie. Klassiek wordt dit hormoon uit de urine van zwangere vrouwen gewonnen. Biotechnologische productie laat toe op minder omslachtige wijze grote hoeveelheden FSH te produceren.

Gentechnieken kunnen ook gebruikt worden om bestaande moleculen te wijzigen. Zo heeft men reeds licht gewijzigde insuline die beter kan koppelen aan de receptor van doelwitcellen dan de klassieke insuline. Ook het veranderen van enkele aminozuren in insuline zorgde al voor een vorm die

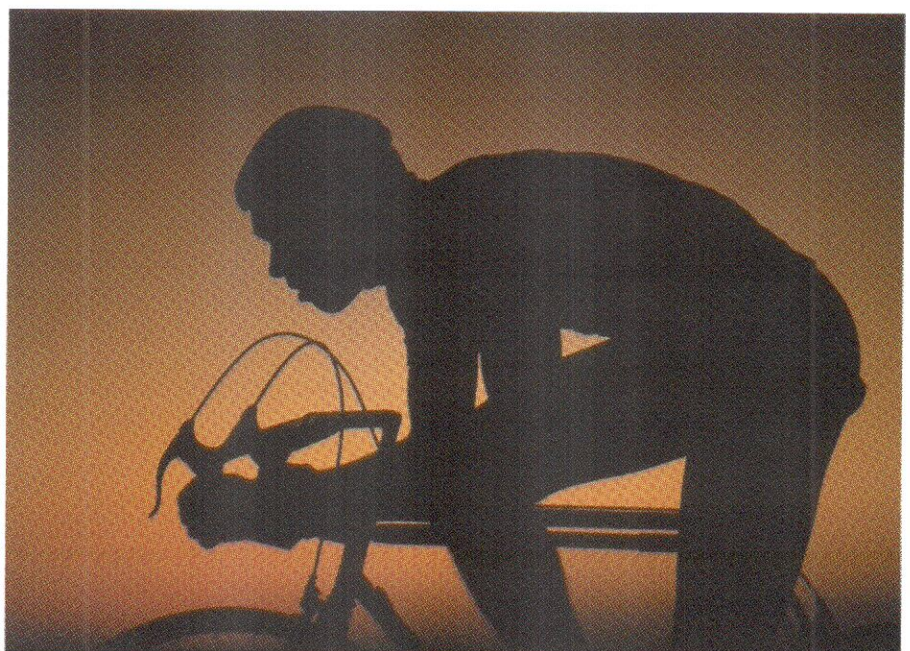
beter oplost in bloedplasma. Men hoopt in de toekomst insuline te kunnen vervangen door een veel kleinere molecule dat enkel het deel bevat dat interageert met de receptor en zo even actief is. Ook andere hormonen kunnen op die manier vervangen worden door kleinere of beter werkende moleculen maar zo ver zijn we nog niet in de praktijk. Het zou wel betekenen dat een heleboel stoffen die nu noodgedwongen geïnjecteerd moeten worden, via de mond kunnen worden toegediend. Eiwitten worden door onze spijsvertering zonder pardon afgebroken, terwijl kleinere moleculen een goede kans maken om afbraak te ontlopen.

Cytokinen

Cytokinen verschillen van hormonen volgens meerdere criteria. Een cytokine kan uitgescheiden worden door verschillende typen cellen, terwijl hormonen gesecreteerd worden door slechts één of twee gespecialiseerde celtypen. Hormonen hebben meestal ook specifieke targetcellen (doelwitten), terwijl cytokinen op verschillende cellen inwerken. Tenslotte beïnvloeden hormonen in principe cellen op afstand, terwijl cytokinen op nabije cellen inwerken. De cytokinen die op dit ogenblik commercieel beschikbaar zijn, kunnen in twee grote categorieën onderverdeeld worden nl. de interferonen en de hematopoïetische groeifactoren.

Interferonen zijn cytokinen die gesecreteerd worden door cellen in antwoord op virale infecties, oncogene stimuli of andere factoren. Zij hebben een brede waaier van antivirale en immunomodulatorische effecten. Interferon-alfa maakt deel uit van de behandeling van bepaalde kankers en wordt ook gebruikt bij de behandeling van chronische hepatitis-B. Interferon-beta is in hoofdzaak aangewezen voor de behandeling van multiple sclerose.

Hematopoïetische groeifactoren zijn eiwitten die de aanmaak van volwassen bloedcellen regelen. Iedere dag worden er onder normale omstandigheden ongeveer 200 miljard nieuwe rode bloedlichaampjes geproduceerd. Erythropoïetine is de groeifactor die instaat voor de aanmaak van rode bloedlichaampjes. Recombinant erythropoïetine wordt vooral gebruikt ter behandeling van anemie bij chronische nierinsufficiëntie, in cytotoxische chemotherapie, in de oncologie, in de chirurgie zoals bij beenmergtransplantaties en in de sport... als doping.



Enzymen

Een aantal belangrijke stofwisselingsziekten worden veroorzaakt door een tekort aan één welbepaald essentieel enzym. Wanneer de ziekte tijdig herkend wordt, kan een enzym-vervangende therapie ingesteld worden om zo de ziekteverwikkelingen gedeeltelijk of grotendeels te voorkomen.

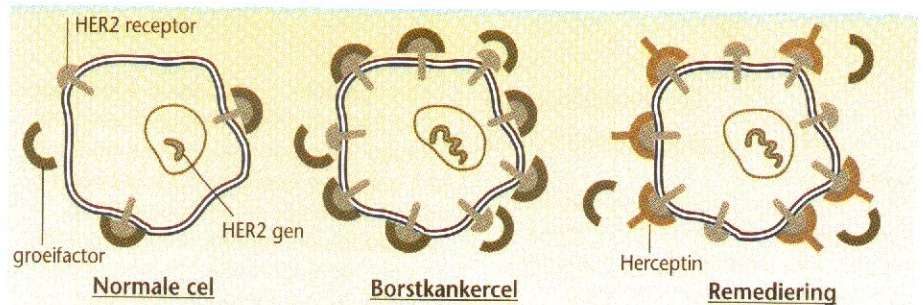
Hemofilie-A en hemofilie-B worden gekenmerkt door een tekort aan enzymen nl. respectievelijk stollingsfactor VIII en IX. Het toedienen van exogene stollingsfactoren kan aangewezen zijn bij bloedingspreventie. Vóór de beschikbaarheid van recombinante factor VIII en IX werden deze producten gewonnen uit humaan donorplasma en stonden patiënten bloot aan infectierisico's, denken we maar aan alle hemofilie-A-patiënten die vóór 1985 behandeld werden en een HIV infectie opliepen.

In andere gevallen kunnen enzymen in verhoogde dosissen toegediend worden met bepaalde therapeutische doeleinden. Bij mucoviscidose of taaislijmziekte leidt een opstapeling van visceuze mucus (met als hoofdcomponent DNA moleculen van afgestorven witte bloedcellen) tot obstructie en infecties van de luchtwegen. Recombinant-DNase breekt dit DNA af en reduceert zo de viscositeit van de mucus. Daardoor verbetert de longfunctie en wordt het infectierisico gereduceerd.

Medicijn uit Vlaams konijn

Het Nederlandse bedrijf Pharming B.V., sinds 1996 ook in Vlaanderen actief, ontwikkelt en produceert biomedische eiwitten in melk van dieren. Pharming verwierf zo internationale faam met Herman, de eerste transgene stier ter wereld die het gen voor menselijke lactoferrine ingebouwd kreeg. Helemaal geslaagd was het experiment wel niet want stieren geven tot nu toe nog steeds geen melk! Maar Herman heeft ondertussen al wel gezorgd voor dochters die het eiwit lactoferrine in hun melk hebben, een geneesmiddel dat aids- en kankerpatiënten en premature baby's kan helpen bij hun afweer.

Een product dat waarschijnlijk als eerste de patiënt gaat bereiken is het enzym (humaan) zure alfa-glucosidase dat gebruikt kan worden bij de behandeling van de ziekte van Pompe. Kinderen met deze ziekte lijden aan een in ernst toenemende spierzwakte die ze in een rolstoel kan doen belanden en die tot ernstige ademhalingsproblemen en de dood kan leiden. In 1989 wisten Rotterdamse onderzoekers het gen voor zure alfa-glucosidase na te maken. Dit was de eerste stap in de uiteindelijke realisatie van transgene konijnen die in hun melk dit enzym produceren. Konijnen blijken door hun snelle voortplanting en hun groot aantal nakomelingen bij uitstek geschikt voor de productie van biomedische eiwitten, waarvan maar een kleine hoeveelheid nodig is. Gemiddeld kan een konijn zowat 100 milliliter per dag produceren, zodat tweehonderd productiedieren al volstaan om aan de marktvraag van zure alfa-glucosidase te beantwoorden.



Normale borstklieren hebben receptoren aan hun oppervlak die gecodeerd worden door het HER2 gen. Groeifactoren binden op deze receptoren waardoor de cel gaat delen en vermenigvuldigen.

Bij 25-30% van de vrouwen met borstkanker worden er te veel HER2 receptoren gevormd, waardoor er een te groot signaal wordt opgewekt en de cellen ongecontroleerd snel delen.

Het HER2 monoklonaal antilichaam, Herceptin, bindt op de HER2 receptoren en verhindert de aanhechting van groeifactoren waardoor de abnormale groei wordt afgeremd.

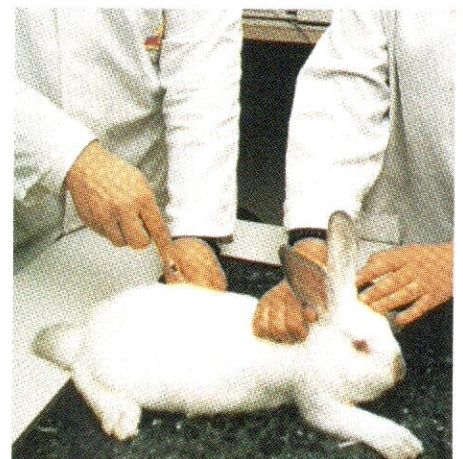
Monoklonale antistoffen

Antistoffen hechten zich zeer gericht aan welbepaalde antigenen o.a. aan eiwitten afkomstig van lichaamsvreemde elementen zoals virussen en bacteriën. Antistoffen vormen hierdoor een uiterst kostbaar instrument waarmee ziekten zoals kanker zowel kunnen opgespoord als behandeld worden. Sommigen noemen deze antistoffen "magic bullets": wanneer ze worden gekoppeld aan actieve bestanddelen (geneesmiddelen), leiden ze deze immers rechtstreeks naar de kankercellen, die vervolgens selectief vernietigd worden.

Monoklonale antilichamen geven reeds 20 jaar bij muizen opmerkelijke resultaten maar dezelfde effecten konden tot

voor kort niet in mensen verkregen worden. De eerste antilichamen, geproduceerd door muizen, gaven nl. problemen. Ons afweersysteem herkent deze stoffen als lichaamsvreemd en vernietigt ze alvorens ze hun werk kunnen doen. Samen met de moeilijkheid om het juiste doelwit-antigen te vinden, waren deze problemen de oorzaak dat 20 jaar lang de 'magic bullets' toch niet het verwachte resultaat gaven. 10 jaar geleden slaagden onderzoekers erin de meeste muizencomponenten te vervangen door menselijke (chimere antilichamen) en recent heeft men transgene muizen antilichamen laten produceren die geen enkel muizencomponent meer bevatten. Een recente studie bewees dat een bepaald gehumaniseerd antilichaam (herceptin) borstkanker dramatisch afremt en de levensverwachting van patiënten met een zeer agressieve borstkanker verlengt met maanden tot zelfs jaren. Dit betekent een grote doorbraak en de verwachtingen zijn dan ook hoog.

Konijnen worden niet enkel veelvuldig gebruikt voor de aanmaak van antilichamen, ze zijn ook uitstekende producenten van biomedische eiwitten (medische melk!).



Recombinante antibiotica

Nu steeds meer bacteriën een manier hebben gevonden om onder de werking van klassieke antibiotica uit te komen, wordt het hoog tijd dat er nieuwe antibiotica komen. In sommige wijken van New York circuleren bijvoorbeeld stammen van de tuberculosebacterie die met geen enkel antibioticum meer te bestrijden zijn. In ziekenhuizen, vooral op de afdeling intensieve zorgen, zwerven bacteriën rond die nog nauwelijks reageren op bestaande antibiotica. Artsen maken zich dus terecht zorgen over de toenemende resistentie. En nieuwe antibiotica zijn er nog niet direct te verwachten.

Vorig jaar zijn Amerikaanse onderzoekers er voor het eerst in geslaagd een nieuwe klasse van antibiotica te ontwerpen. Ze vonden een manier om de productielijn van bacteriën naar hun hand te zetten. Dat is een doorbraak omdat op die manier een hele reeks nieuwe antibiotica kan worden geproduceerd. Om antibiotica te synthetiseren maken bacteriën gebruik van bepaalde biosynthesewegen die uit verschillende stappen bestaan, een soort lopende band. Onderzoekers slaagden erin de band na enkele stappen stil te leggen, het halfafgewerkte product te vervangen door een eigen maaksel en de band weer in gang te zetten. Door de eigen maaksel te variëren konden ze de bacteriën nieuwe antibiotica doen maken. Artsen zullen nog wel enkele jaren geduld moeten hebben vooraleer ze deze nieuwe antibiotica kunnen gaan voorschrijven. Tussen het vinden van een nieuwe molecule en het uiteindelijk op de markt brengen van een nieuw geneesmiddel zitten namelijk jaren van onderzoek en testen op haalbaarheid en veiligheid (MENS nr. 16)

Het logo van een project dat het ontwikkelen van een vaccin tegen malaria beoogde, in het kader van het Europees Eureka programma!

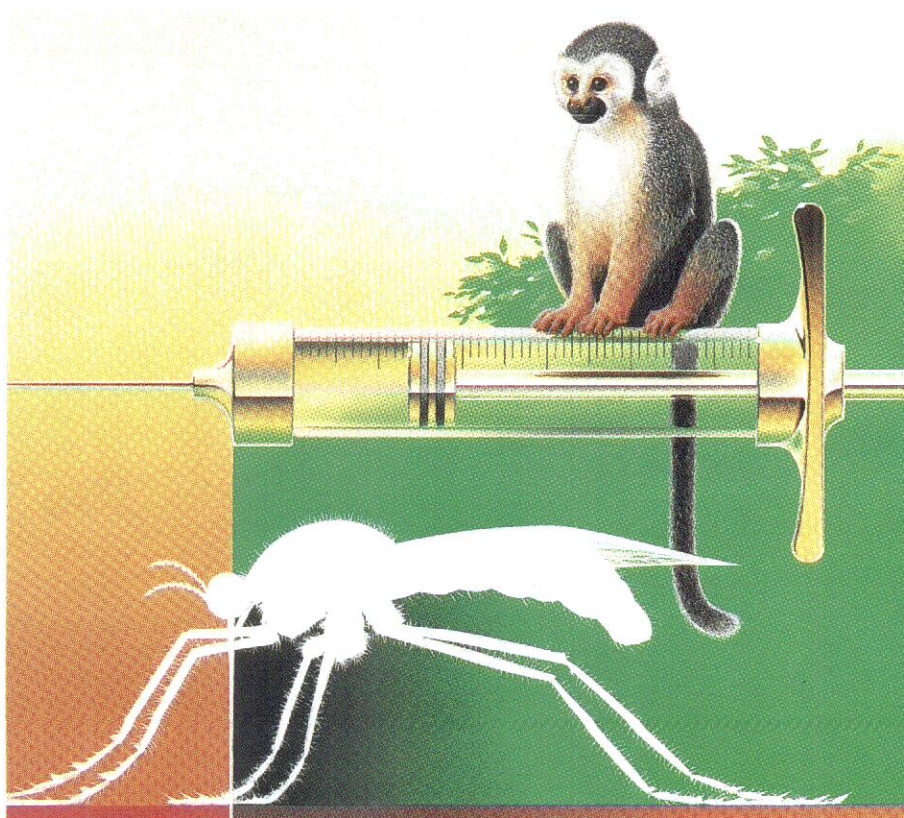
De strijd tegen malariaresistentie

Het 'Global Malaria Eradication Programme' dat de wereldgezondheidsorganisatie in 1955 lanceerde is mislukt. Dit ambitieuze programma mikt op de totale uitroeiing van malaria door bestrijding van muggen met behulp van DDT in combinatie met gecontroleerd gebruik van medicijnen. Na aanvankelijke successen bleek deze aanpak in vele landen niet effectief. De mug werd resistent tegen DDT en andere insecticiden, en sommige malariaparasieten werden reeds resistent tegen bijna alle natuurlijke en synthetische geneesmiddelen zoals kinine en chloroquine. Gentechnologische technieken kunnen wellicht een uitweg bieden om malaria een halt toe te roepen. Met behulp van de knock-out technologie heeft men reeds genen (het TRAP-gen en het CS-gen) gevonden die van belang zijn bij de vorming en de beweeglijkheid van de parasiet. Door het uitschakelen van deze genen werd de verdere ontwikkeling van de parasiet geblokkeerd.

Genetisch gewijzigde parasieten kunnen direct van nut zijn bij de speurtocht naar vaccins. Diverse laboratoria werken o.a. aan een vaccin dat moet voorkomen dat parasieten de rode bloedlichaampjes kunnen binnendringen zodat ziekteverschijnselen die samenhangen met de bloedinfectie uitblijven. In plaats van een vaccin dat zich op één enkel stadium van de parasiet richt, werkt men ook aan een cocktailvaccin dat van meerdere stadia eiwitten bevat om zo de parasiet op verschillende momenten in zijn levenscyclus te kunnen treffen.

Vaccinatie met complete, maar verzwakte parasieten zou veel beter beschermen dan de tot nu toe geproduceerde synthetische vaccins die alleen maar een beperkt aantal eiwitten bevatten. Daarom onderzoekt men ook de mogelijkheden om parasieten door een gerichte genetische wijziging te verzwakken.

Ook door transgene muggen te maken die de malariaparasiet minder efficiënt kunnen overdragen en deze in de natuur los te laten, hopen onderzoekers de overdracht van malaria in te dammen. Andere onderzoekers speuren naar een gen dat bepaalt of een muskiet een mens of een ander zoogdier verkiest voor het verkrijgen van een bloedmaaltijd. Mogelijk kunnen ook de muggen zelf resistent gemaakt worden tegen de malariaparasiet.



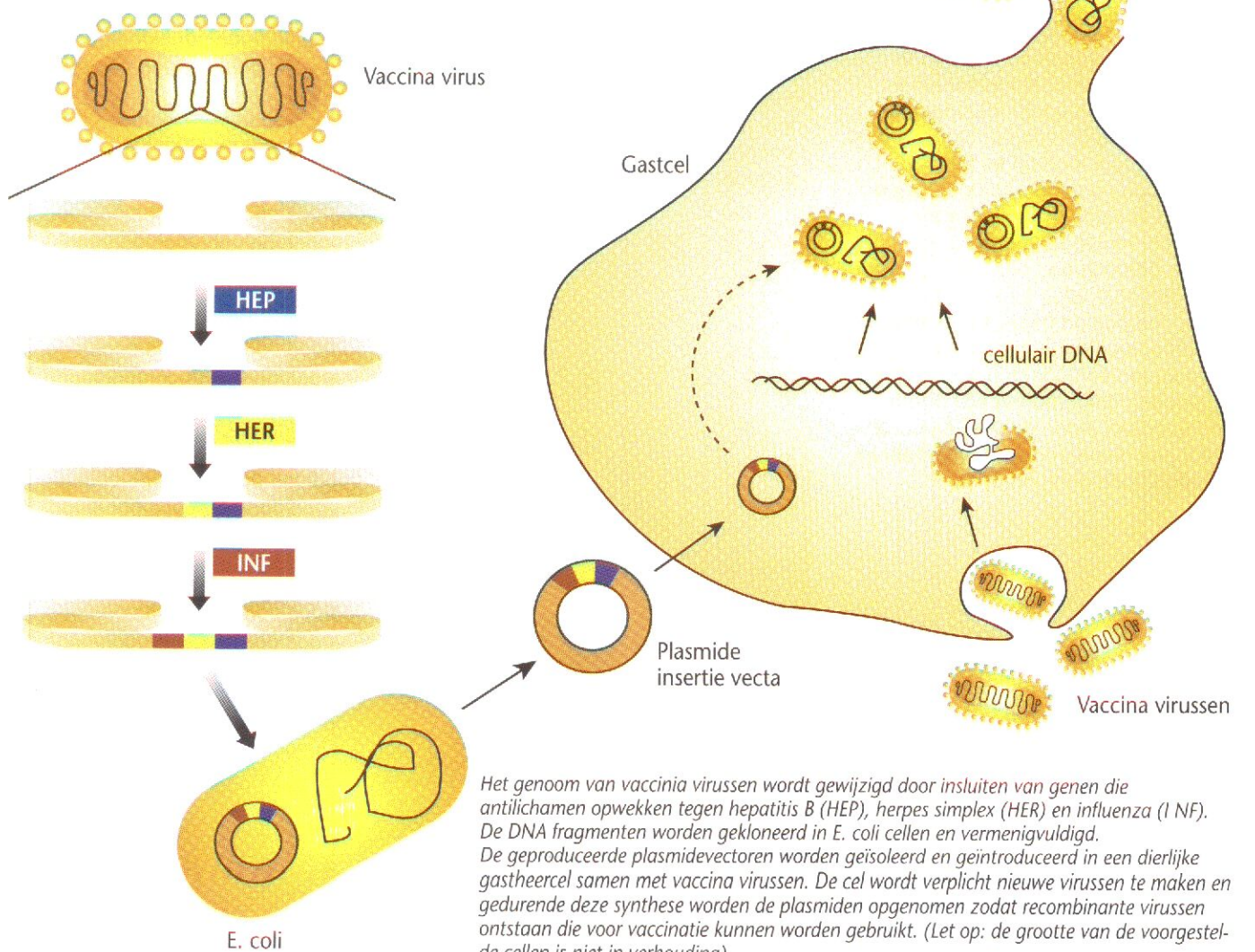
Een virus als medicijn

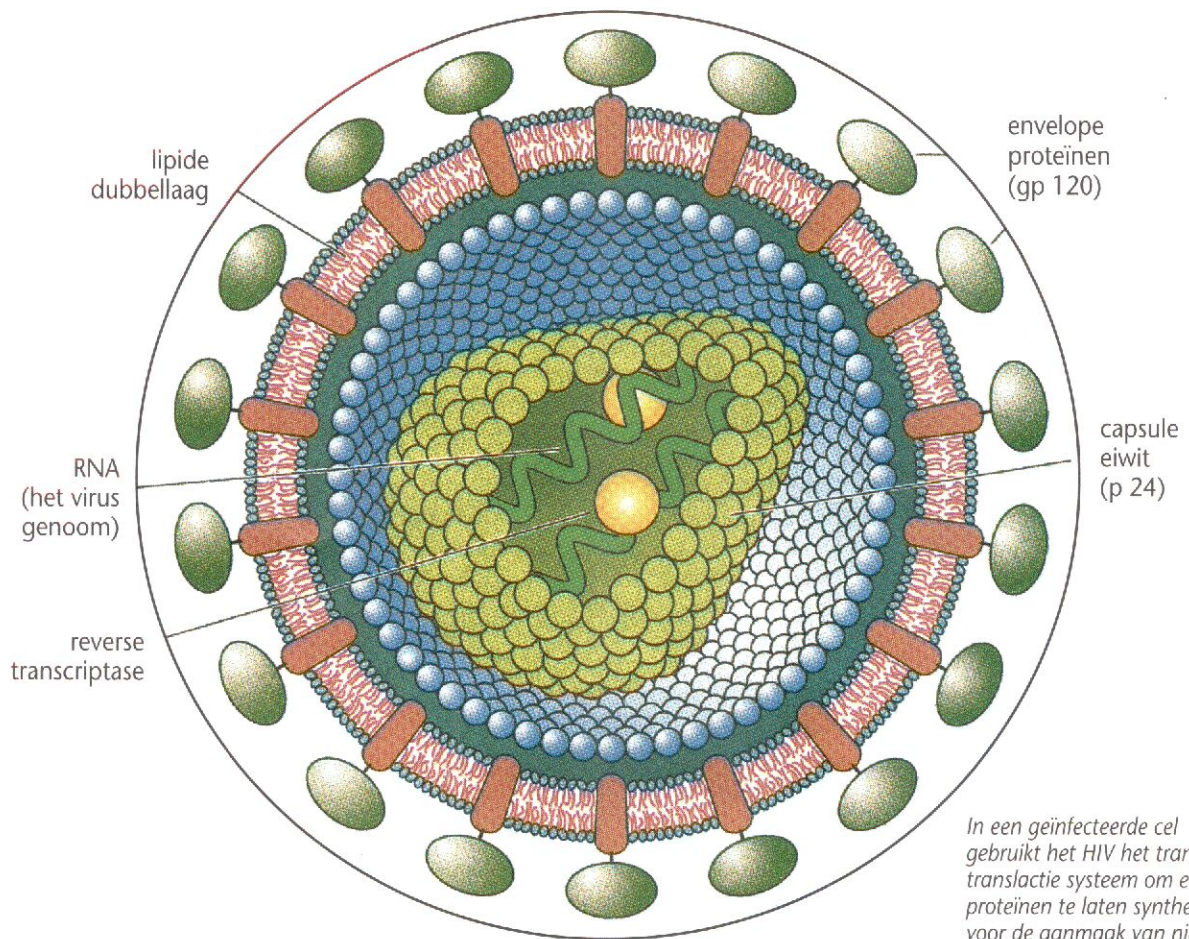
Traditionele vaccins gebruiken afgezwakte of dode ziekteverwekkers (virussen, bacteriën) om een afweerreactie op te wekken. Niettegenstaande deze vaccins erg veilig zijn, bestaat er steeds bij de zogenaamde 'levende vaccins' een klein risico op infectieuze complicaties. Recombinante vaccins verkrijgt men meestal door enkel en alleen de genen voor de afweer- oproepende delen van de ziekteverwekker, in te bouwen in een ongevaarlijke bacterie of virus, die men dan geeft als vaccin. Het belangrijkste recombinate vaccin is het hepatitis-B-vaccin dat reeds sinds 1986 op de markt is. Het voordeel van deze vaccins is uiteraard dat dit het infectieus risico tot nul herleid.

Een fascinerende ontwikkeling is om afweeroproepende delen van verschil-

lende microben in één drager (meestal een virus) in te bouwen. Op deze manier ontstaat een polyvalent vaccin dat tegen meer dan één infectieziekte beschermt.

Een andere voor de hand liggende optie is om het originele organisme als vaccin te gebruiken nadat het ziekteverwekkende gen eruit is geknipt. Ook kunnen mutaties aangebracht worden zodat de virulentie-factoren zoals de aanhechtingseiwitten of toxines, worden uitgeschakeld. Op dergelijke wijze is reeds een veelbelovend choleravaccin ontwikkeld waarbij een toxine-deficiënte bacteriestam gebruikt wordt als vaccin. Hoewel de meeste vaccins nog klassieke vaccins zijn, worden op dit ogenblik meer dan 60 biotechnologische vaccins ontwikkeld. Aan een vaccin tegen malaria wordt met man en macht gewerkt. Tests bij mensen zijn aan de gang.





DNA vaccinatie en HIV

DNA vaccinatie is een nieuwe uitdaging in de strijd tegen ziekten. Acht jaar geleden werd namelijk ontdekt dat het direct inspuiten van DNA (dat bijvoorbeeld codeert voor één of meerdere vreemde genen van een micro-organisme) een immuunreactie teweeg kan brengen.

Preklinische studies zijn reeds opgezet voor diverse infecties waaronder hepatitis-B, herpes, influenza, rubella, salmonella, tetanus, malaria, reumatoïde artritis en andere.

Ook in de strijd tegen AIDS zijn wetenschappers van over heel de wereld op zoek naar DNA vaccins. Deze zoektocht is noodzakelijk als we weten dat in 1997 per dag 16000 nieuwe infecties gerapporteerd werden waarvan meer dan 90% in de ontwikkelingslanden. Berekeningen voorspellen dat we de 21ste eeuw binnen gaan met op zijn minst 40 miljoen volwassenen en kinderen die geïnfecteerd zullen zijn met het HIV.

De problemen die overwonnen moeten worden bij AIDS zijn echter gigantisch. Alleen al het enorme aantal genetische varianten die er bestaan van HIV. Zo komen er in de Verenigde Staten andere subtypen voor dan bijvoorbeeld in Afrika of in Zuid-Azië. Ook varieert het virus binnen één en hetzelfde individu. Na amper 2,5 dagen zijn reeds 50% van de virussen veranderd. Dit maakt dat het vinden van een adequaat vaccin een zeer zware opdracht is.

Niettemin staande deze en andere moeilijkheden zijn er sinds 1988 in totaal 27 kandidaat DNA-vaccins in testfase. De meeste bevinden zich echter nog in fase I dwz. ze worden uitgetest op een klein aantal vrijwilligers. Sommige vaccins worden reeds getest op veiligheid en immunogeniciteit bij een grotere groep van mensen waaronder personen uit risicogroepen. Het goede nieuws is dat bij meer dan 2000 gevaccineerde vrijwilligers de meeste kandidaat vaccins bewezen hebben veilig te zijn en de aanmaak van antilichamen te induceren.

Heel belangrijk in de ontwikkeling van een HIV vaccin (waarbij een HIV eiwit als immunogeen wordt gebruikt) is de recente beslissing om in de Verenigde Staten een fase III experiment (uittesten van duizenden vrijwilligers uit hoge risicogroepen met ook placebo-controle groepen) op te starten. Dit experiment loopt minstens vijf jaar en zal voor het eerst toelaten de werkzaamheid van een vaccin bij de mens te evalueren. Dit is een belangrijk precedent voor de toekomst.

Een andere mogelijke toepassing bij mensen is vaccineren met een kreupel gemaakt maar levend HIV (o.a. het delta-4 virus waarbij vier genen werden verwijderd). Bij dieren hebben deze vaccins hun werking reeds bewezen. De eerste experimenten bij mensen zijn recent gestart.

Xenograften: Wie wil een varkenshart?

Iedereen kent het probleem van het tekort aan donororganen. Ruim 2200 Belgen en Nederlanders staan op de 'dodenlijst'. Hun leven hangt af van de beschikbaarheid van een donororgaan. Als wetenschappers de afstotingsbarrière kunnen overwinnen, krijgt de mens in de toekomst organen van dieren. Bij xenotransplantatie wordt lichaamsvreemd (xeno) dierlijk weefsel overgezet naar de mens. Hoop wordt momenteel gevestigd op de mogelijkheid van het creëren van transgene varkens voor xenotransplantaten.

De mens kreeg al eerder iets van het dier. Bij AIDS en Ebola vermoedt men dat het virus overgedragen werd via apen. Sinds enige tijd lijkt het ook aannemelijk dat de dolkoeienziekte of BSE kan overgaan van dier op mens. Het is dan ook een belangrijke vraag of transplanteren van dierlijke organen niet nog meer ziekten met zich gaat meebrengen. Recent werd vastgesteld dat retrovirussen uit varkensweefsel menselijke cellen kunnen infecteren. Toch zijn bij mensen die in contact kwamen met varkensweefsel (door een tijdelijke aansluiting op een varkenslever) nog geen retrovirale infecties vastgesteld. Tot op heden zijn er dus geen aanwijzingen van besmettingen van varkens naar mensen. Dit is één van de redenen waarom bij xenotransplantatie men vooral denkt aan het varken als donor. Een andere reden is dat de organen van het varken als hart, nier en lever, anatomisch zeer sterk lijken op die van de mens. Ook zijn

varkens eenvoudig te fokken. Het wetenschappelijk onderzoek is er momenteel op gericht dierenorganen te creëren waarvan de genetische samenstelling zo is gewijzigd dat ze geen hyperacute afstoting meer opwekken.

In Engeland bijvoorbeeld fokt het bedrijf Imutran genetisch gemodificeerde varkens met een menselijk eiwit, het DAF-eiwit. DAF reguleert de reactie van bloedeiwitten op lichaamsvreemde stoffen en zou de afstoting van varkensorganen die in een mens worden geïmplant, tegengaan. Voorlopig worden deze organen enkel gebruikt om te transplanteren tot er een geschikt menselijk orgaan gevonden wordt met de bedoeling enkele dagen of weken te overbruggen. Als de technologie echter verder op punt kan worden gezet, hoopt men in de toekomst dierenorganen als definitieve organen te kunnen transplanteren.

Klonen van dieren en mensen

Geiten die medicijnen tegen hartaanvalen produceren, muizen die in hun melk menselijke hormonen maken, varkens die organen leveren... zeer interessante maar moeizame en dure creaties. Met de nieuwe mogelijkheid van klonen (uitgaande van één organisme meerdere identieke volwaardige organismen maken) volstaat het nu één transgeen dier te creëren. Als het aan de verwachtingen beantwoordt, kunnen zoveel dieren als gewenst gekloond worden. Terwijl bij de hoogst ontwikkelde dieren, de gewervelde dieren, voortplanting

door klonen uiterst zeldzaam is, komen klonen in het plantenrijk overal op grote schaal voor. Planten kunnen daarom worden vermeerderd via stekken, scheuren, uitlopers en enten. Sinds de jaren '70 wordt ook door onderzoekers in laboratoria ijverig gekloond en de laatste jaren worden gekloonde planten ook commercieel geproduceerd (MENS nr. 26).

Embryoklonen

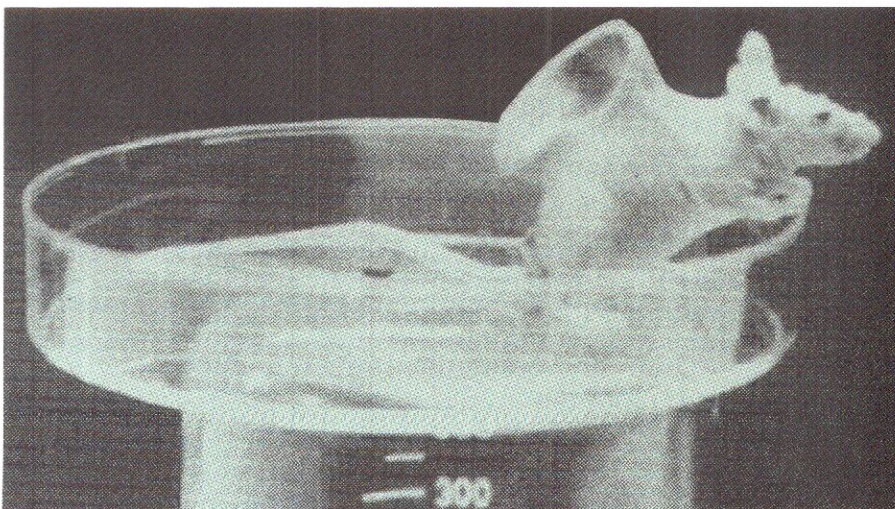
Bij dieren ligt het anders. De cellen van volwassen dieren (spiercellen, zenuwcellen, bloedcellen,...) zijn zeer gespecialiseerd en daardoor niet in staat om zelfstandig uit te groeien tot nieuwe individuen. De technologie om dieren te klonen is dan ook veel moeilijker dan bij planten en wordt nog volop op punt gesteld.

Wat wel reeds jaren in de veeteelt wordt toegepast, is het klonen van een embryo. Embryo's van koeien, zestien of tweeëndertig cellen groot, worden gesplitst in twee of drie delen, die vervolgens elk bij een andere vaars worden ingeplant. Het resultaat levert dan identieke twee- of drielingen op. Het maken van embryoklonen is de gemakkelijkste manier gebleken om een stel identieke koeien of schapen te verkrijgen. Ook bij mensen werden gelijkaardige proeven gedaan maar wel op afwijkende vruchten die nadien werden vernietigd.

Het begon allemaal met kikkers...

Om het aantal klonen op te drijven, wordt nu celkerntransplantatie als techniek gebruikt. De techniek berust op het feit dat de cellen van zeer jonge embryo's nog niet gedifferentieerd zijn (totipotent). Een embryo bestaande uit bijvoorbeeld 32 cellen, wordt in afzonderlijke cellen gesplitst. Vervolgens haalt men de kernen (die de genetische informatie bevatten) uit deze embryocellen en brengt ze in onbevuchte eicellen van soortgenoten waaruit vooraf met een pipetje alle kern-DNA werd weggezogen. Dit resulteert in 32 embryo's met identieke genetische informatie, althans wat het kern-DNA betreft. Het mitochondriaal-DNA is immers van de onbevuchte eicel afkomstig. Vervolgens wordt elk embryo in een surrogaatmoeder geplaatst.

"Tissue engineering" beoogt het kweken van reserveorganen uit enkele lichaamscellen. Onderzoekers uit de Harvard Medical school kwamen enkele jaren geleden spectaculair in het nieuws met de creatie van een muis met een menselijke oorschelp, gekweekt uit kraakbeencellen. "Tissue engineering" zou een mogelijk alternatief kunnen betekenen voor orgaantransplantatie.



De eerste kerntransplantatie werd uitgevoerd in 1952 bij kikkers. Inmiddels is er al veel gebruik gemaakt van deze techniek bij koeien, vooral in de Verenigde Staten. Maar ook schapen, muizen en apen werden op deze manier reeds gekloond.

Het rendement van deze techniek was tot voor kort echter vrij laag. Om echt grote kudden van dieren te krijgen gingen onderzoekers uit de gekloonde embryo's opnieuw cellen losmaken om ook hun kernen te transplanteren. Door deze stap telkens te herhalen maakten Australiërs bijvoorbeeld al vijfhonderd runderklonen.

Dolly en haar vier moeders

Met het schaap Dolly werd recent een nieuwe stap gezet. Schotse wetenschappers slaagden erin een uiercel van een schaap als donorcel te gebruiken voor de kerntransplantatie. Ze wisten dus een volledig gedifferentieerde, volwassen zoogdiercel terug totipotent te maken en er een gezond dier uit te creëren.

De truc om gespecialiseerde cellen terug totipotent te maken bleek te liggen in het uithongeren van de cellen. Ian Wilmut en medewerkers van het Roslin Institute te Schotland lieten in het beruchte experiment de uiercellen van een zesjarige drachtige ooi drie tot zes keer verder delen. Vijf dagen voor de kerntransplantatie werd de serumconcentratie in het cultuurmedium van 10 op 0,5 procent teruggebracht, zodat de celcyclus tot stilstand kwam en de cellen in een bepaalde delingsfase bleven steken waardoor ze blijkbaar terug totipotent werden.

In totaal werden zo 277 uiercellen van een zesjarige ooi van het witte ras Finn Dorset versmolten met geleegde eicellen

van een Scottisch Blackface, een ras met een zwarte kop. De 277 behandelde cellen gingen in de afgebonden eileiders van een reeks Scottisch Blackfaces die met hormooninjecties in de juiste 'stemming' waren gebracht. Na zes dagen recupereerden de onderzoekers 247 gefuseerde cellen waarvan slechts 29 zich normaal gedeeld hadden tot het morula of blastulastadium. De 29 eicellen werden vervolgens ingeplant in de baarmoeder van 13 ooiën. Resultaat op 5 juni 1996: één lam. Het eerste dier dat niet uit embryonale cellen, maar uit volwassen weefselcellen werd gekloond.

Waarom klonen?

De voordelen van kloontechnieken voor de geneeskunde zijn enorm. Van een transgeen dier kunnen zoveel cellen als gewenst naar onbevuchte ontkernde eicellen worden overgebracht en bij een onbeperkt aantal draagmoeders worden ingeplant. Deze techniek maakt het mogelijk biotechnologische geneesmiddelen goedkoper, sneller en in optimale kwaliteit en kwantiteit te produceren.

Genetisch identieke transgene dieren zijn ook belangrijk in de medische research. Op deze manier kan gewerkt worden met dierklonen met exact dezelfde kenmerken. Experimenten zijn zo beter te controleren en er zijn minder dieren nodig. Nu moeten wetenschappers werken met grote aantallen proefdieren om de invloed van de verschillen tussen de proefdieren op het eindresultaat te kunnen wegfilteren.

Naast de geneeskunde heeft ook de klassieke veeteelt grote interesse voor deze techniek. Het voordeel optimale boerderijdieren te kunnen klonen zal voor eenieder duidelijk zijn. De techniek zou echter ook aangewend kunnen worden om bedreigde diersoorten in stand te houden.

Maar voorlopig zijn we nog niet zover. De techniek van klonen is op dit moment verre van rendabel. Om één Dolly te krijgen moesten meer dan duizend eicellen geoogst worden. Er zijn nog zeer veel onopgeloste problemen en de techniek van klonen roept bij veel mensen nogal wat vragen en bedenkingen op.

JA maar... Of wordt het NEE?

Vroeg of laat wordt het wellicht ook mogelijk om mensen te klonen uit volwassen cellen. Klonen met embryonale cellen is hoogstwaarschijnlijk al mogelijk want bij apen is dat al gelukt. En dan is de fundamentele vraag: moet het ook kunnen? De onmiddellijke reacties op Dolly waren voor het overgrote deel van het type 'nooit met de mens'. Maar is dit voor iedereen zo?

Ondertussen is er wel reeds een mondiale en Europese consensus gegroeid om klonen met reproductieve doeleinden, het klonen van mensen dus, te verbieden.

Het is niet mogelijk om in dit tijdschrift alle referenties van artikelen en boeken op te nemen daar de informatie over dit onderwerp zeer diffuus verspreid is. Op aanvraag kan evenwel een lijst met bronvermeldingen bekomen worden.

Enkele boeken die interessant zijn en meer informatie geven:

"Onze genen, handboek menselijke erfelijkheid", Marnix Cokelaere en Pol Craeynest, uitgeverij Acco

"Klonen, mensen en dieren op bestelling",

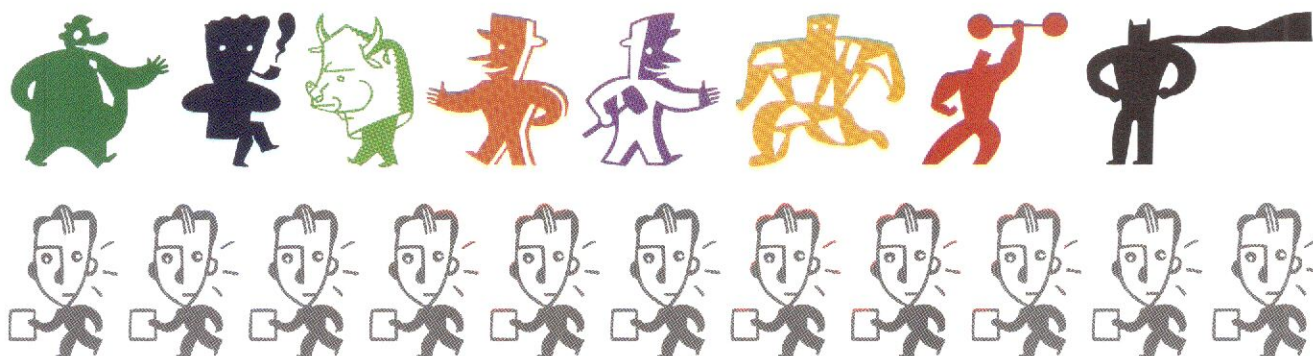
"De genetische revolutie",

Pieter Van Dooren, Davidsfonds

"Klonen, over het kunstmatig kopiëren

van leven", Wilfried Kruit, uitgeverij Contact

"De DNA-makers", wetenschappelijke bibliotheek van Natuur en Techniek.



VLAANDEREN: een traditie in biotechnologie

Het biotechnologisch onderzoek in Vlaanderen heeft een belangrijke rol gespeeld in de ondersteuning en ontwikkeling van de moderne wereldwijde biotechnologie. In de zeventiger jaren verwierven Vlaamse onderzoeksgroepen belangrijke innovatieve kennis in een brede waaier van biotechnologische disciplines. Zo ontrafelden Vlaamse onderzoekers als eersten de sequentie van een gen en later van een volledig genoom. Deze ontdekkingen lagen aan de basis van onze kennis op verscheidene biotechnologische gebieden. Onderzoek rond plantentechnologie in Vlaanderen staat aan de wereldtop. Uitmuntend werk wordt geleverd in het cardiovasculair onderzoek en in de identificatie van gendefecten geassocieerd met diverse syndromen gaande van kanker tot neurodegraderende ziekteverschijnselen zoals Alzheimer.

In Vlaanderen bestaat er een merkwaardige concentratie aan biotechnologische centra met wereldreputatie. VIB, het Vlaams Interuniversitair Instituut voor Biotechnologie, is er een van. Het omvat 9 excellente biotechnologische research departementen gelokaliseerd op vier universitaire campussen. In totaal zijn meer dan 700 onderzoekers aan VIB verbonden. Daarnaast ondersteunt VIB de valorisatie van biotechnologische onderzoeksresultaten, wat reeds aanleiding gaf tot twee biotech nieuwkomers: Devgen en CropDesign. VIB informeert en stimuleert het maatschappelijk debat rond biotechnologie. Deze concentratie gekoppeld aan innoverende kracht en wetenschappelijke expertise maakt van Vlaanderen een regio met enorme potentie op het vlak van biotechnologie.

De 9 research departementen van VIB

Departement Moleculaire Biologie (RUG, Frans Van Roy)

Departement Genetica (RUG, Marc Van Montagu)

Departement Transgene Technologie en Gentherapie (KULeuven, Désiré Collen)

Departement Menselijke Erfelijkheid (KULeuven, Guido David)

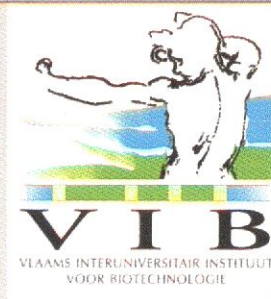
Departement Microbiologie (VUB, Nicolas Glansdorff)

Departement Immunologie, Parasitologie en Ultrastructuur (VUB, Lode Wyns)

Departement Celgroei, Differentiatie en Ontwikkeling (KULeuven, Danny Huylebroeck)

Departement Neurogenetica (UIA, Christine Van Broeckhoven)

Departement Medische Proteïnechemie (RUG, Joel Vandekerckhove)



VIB
Ann Van Gysel
Rijvisschestraat 120
B - 9052 Zwijnaarde, Belgium
tel : 32 9 2446611, fax : 32 9 2446610
www.VIB.BE

Een beperkt overzicht van de Vlaamse universiteiten en instituten waar biotechnologie-onderzoek gebeurt.

- GENT: Universiteit Gent (RUG), VIB-RUG, Departement voor Plantenveredeling, Centrum voor Landbouwkundig Onderzoek
- BRUSSEL: VIB-VUB, Vrije Universiteit Brussel (VUB)
- LEUVEN: Universiteit Leuven (KULeuven), VIB-KULeuven
- KORTRIJK: Universiteit van Kortrijk (KULAK)
- DIEPENBEEK: Dr. Willems-Instituut (LUC)
- MOL: Vlaams Instituut voor Technologisch Onderzoek (VITO)
- ANTWERPEN: Instituut voor Tropische Geneeskunde (ITG), Universiteit Antwerpen (UA), VIB-UIA

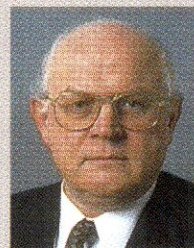
'Founder Fathers' van de Vlaamse Biotechnologie



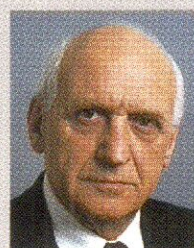
Walter Fiers



Marc Van Montagu



Désiré Collen



Herman Van den Berghe



Nicolas Glansdorff