

EFOP-3.4.3-16-2016-00014

2020

AP4\_TTIK KÁRPÁT-MEDENCEI OKTATÁSI TÉR KIALAKÍTÁSA  
ÉRDEKÉBEN TETT TEVÉKENYSÉGEK A TTIK-N  
BBTE OKTATÁSI EGYÜTTMŰKÖDÉS

# ŐSSEJTEK ÉS GENETIKAILAG MÓDOSÍTOTT ORGANIZMUSOK

DR. PANKOTAI TIBOR

TUDOMÁNYOS FŐMUNKATÁRS

SZTE FOK ORÁLBIOLÓGIAI ÉS KÍSÉRLETES FOGORVOSTUDOMÁNYI TANSZÉK

**SZÉCHENYI** 2020



MAGYARORSZÁG  
KORMÁNYA

Európai Unió  
Európai Szociális  
Alap



**BEFEKTETÉS A JÖVŐBE**

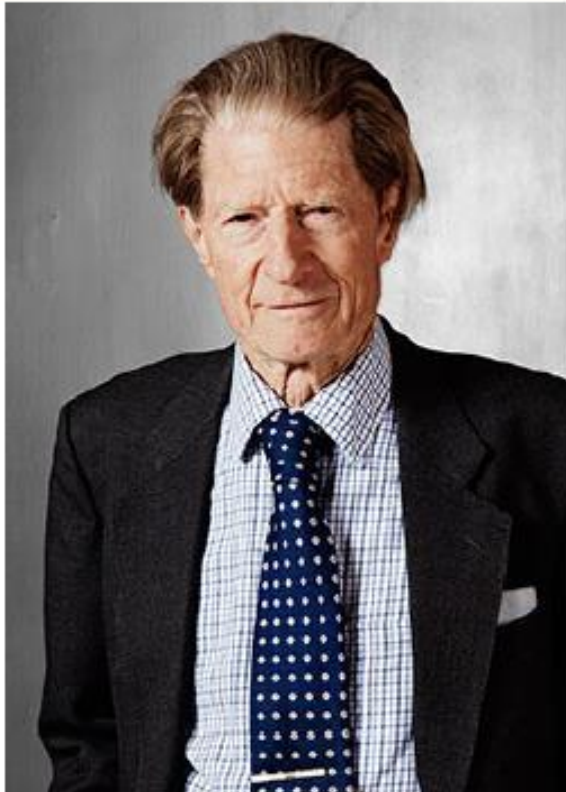


**Nobelforsamlingen**

The Nobel Assembly at Karolinska Institutet



## The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012



Sir John B Gurdon



Shinya Yamanaka

"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"



# Őssejtek tulajdonságai

## Az őssejtek két jellemző tulajdonsága:

### - Önmegújítási képesség

Aszimmetrikus sejtosztódással képesek a differenciálatlan állapotuk fenntartására: az egyik sejt elkötelezetlen marad, a másik differenciálódik (statisztikusan igaz).

### - Differenciálódási potenciál: képesek többféle differenciált sejt létrehozására

Totipotens/omnipotens: embrionális és extraembrionális szövetek sejtjeit

Pluripotens: a 3 csíralemez sejtjeit, de extraembrionális szöveteket nem

Multipotens: egy leszármazási vonalon belüli sejtekké képes differenciálódni

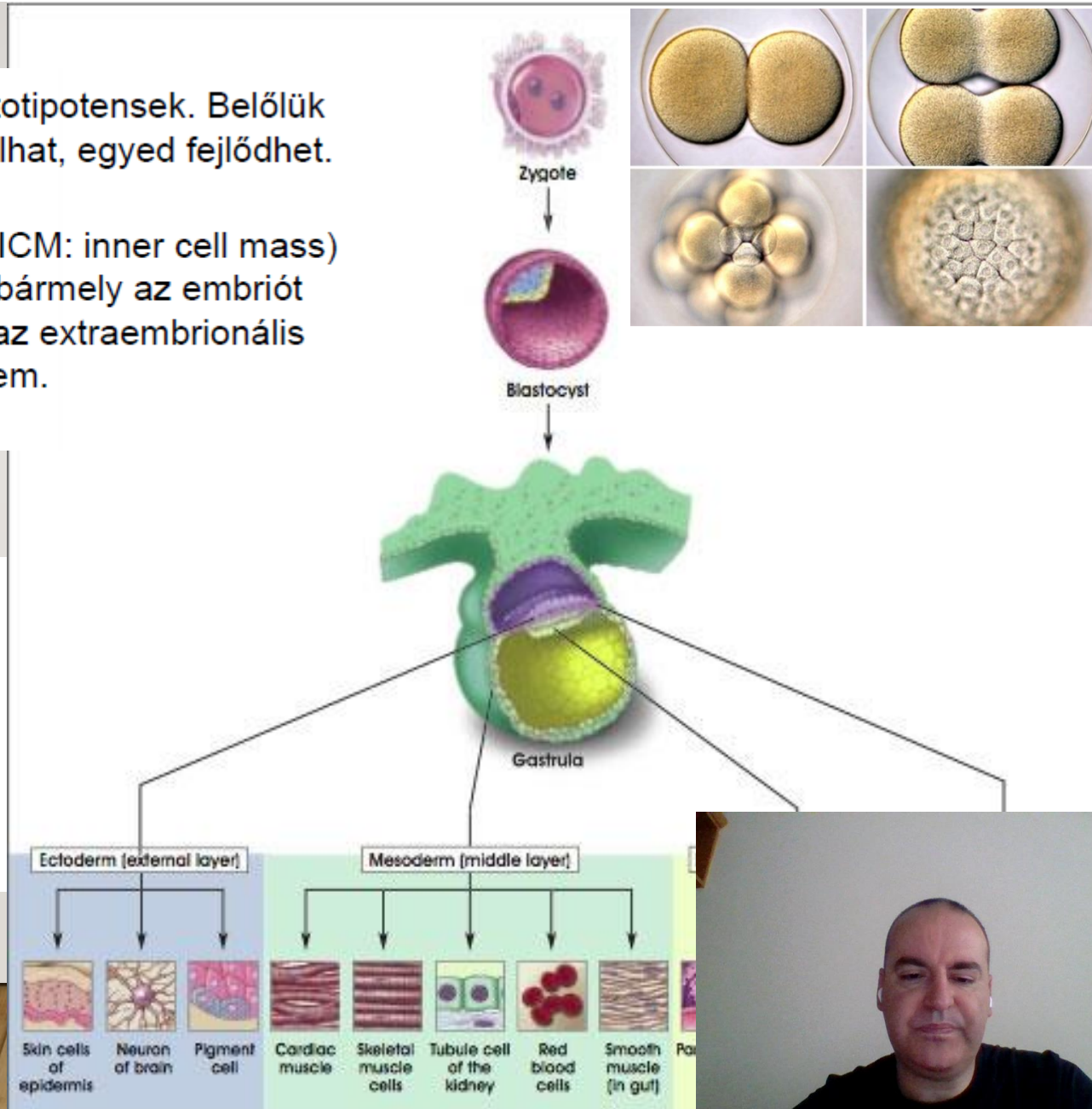


# Őssejtek, differenciáció

A zigóta, korai morula sejtjei totipotensek. Belőlük bármilyen sejt, szövet kialakulhat, egyed fejlődhet.

A hólyagcsíra embriócsomó (ICM: inner cell mass) sejtjei pluripotensek. Belőlük bármely az embriót alkotó szövet kialakulhat, de az extraembrionális szövetek (trophektoderma) nem.

A sejtek további differenciálódása során különféle előalakok alakulnak ki. Ezek a szöveti őssejtek multipotensek, sokféle, de *korlátozott számú* sejttypussá képesek átalakulni.

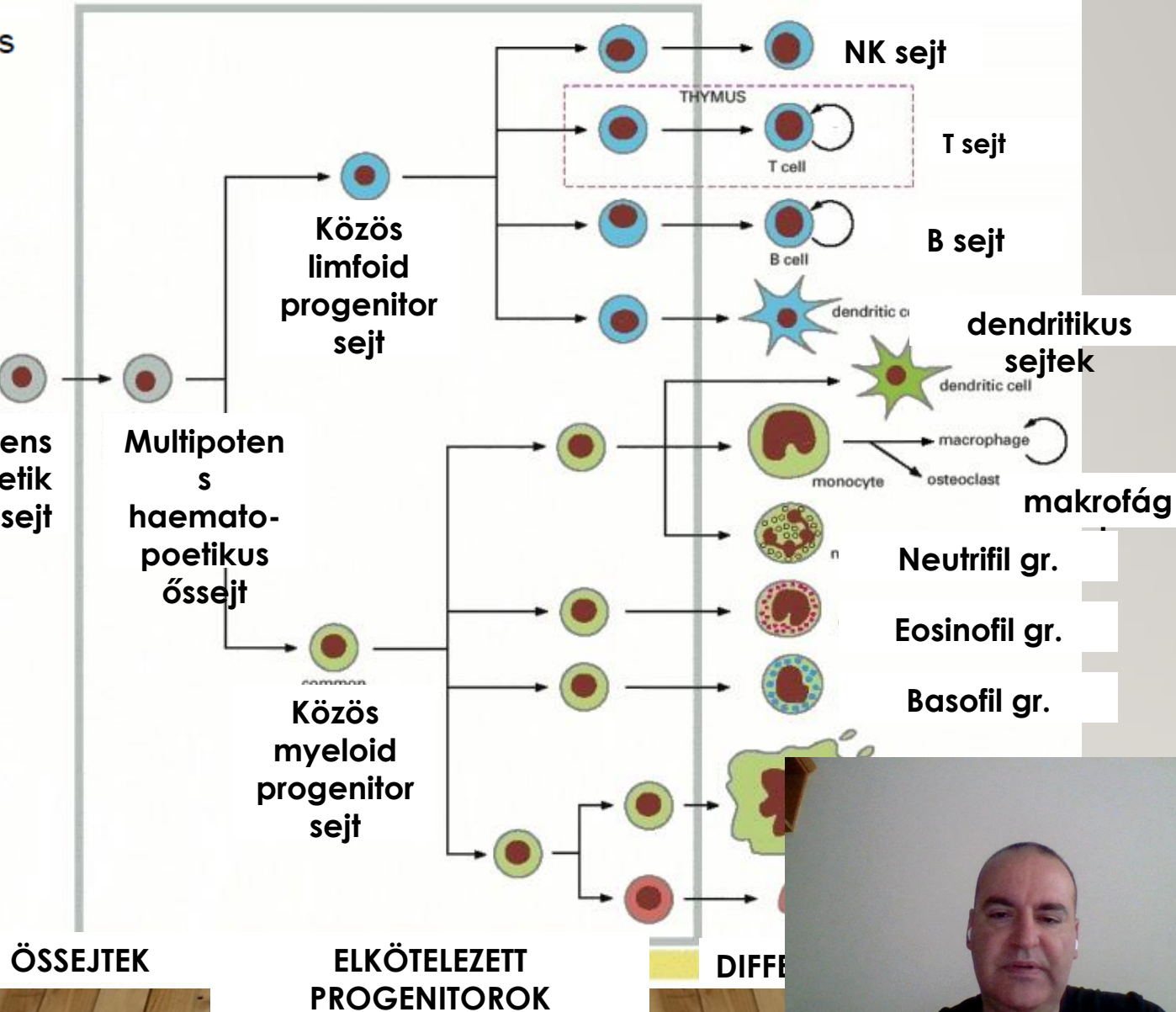


# Őssejtek, differenciáció

Szöveti őssejtek számos szövetben megtalálhatóak és belőlük kinyerhetőek. (pl. csontvelő, zsírszövet, hajhagyma)

Multipotens haematopoetikus őssejt

Az ábra a vér alakos elemeinek differenciációja mutatja be multipotens homeopoetikus őssejtekből progenitor sejteken keresztül.



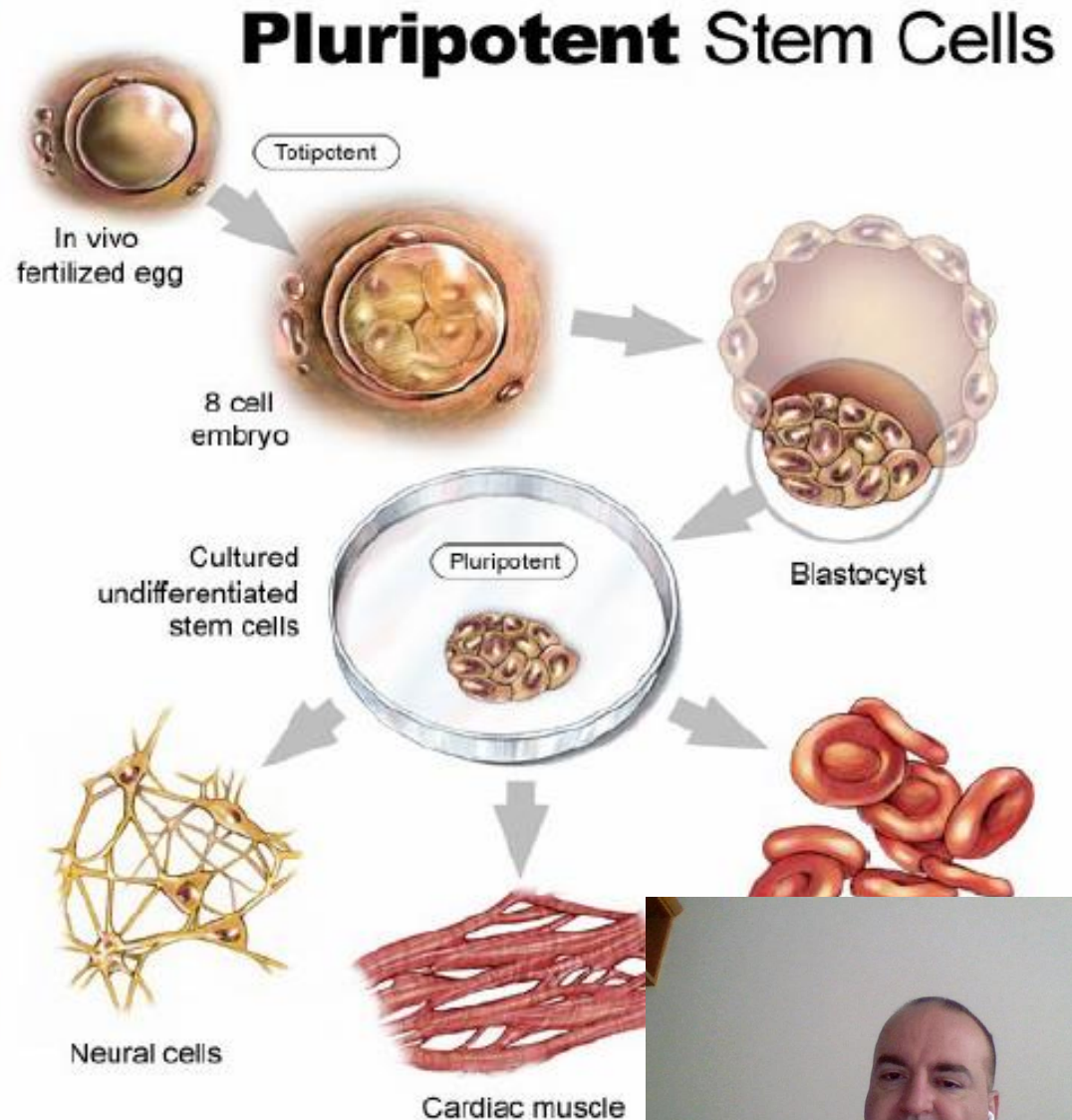
# Őssejtek, differenciáció

Embrionális őssejt (ES) kultúrákat a blasztociszta állapotú embrió embriócsomó (ICM) sejtjeiből hoznak létre.

Az kivett sejtek kultúrában növeszthetők (fibroblaszt tápláló sejt rétegen, vagy szintetikus tápfolyadékban növekedési faktorokkal).

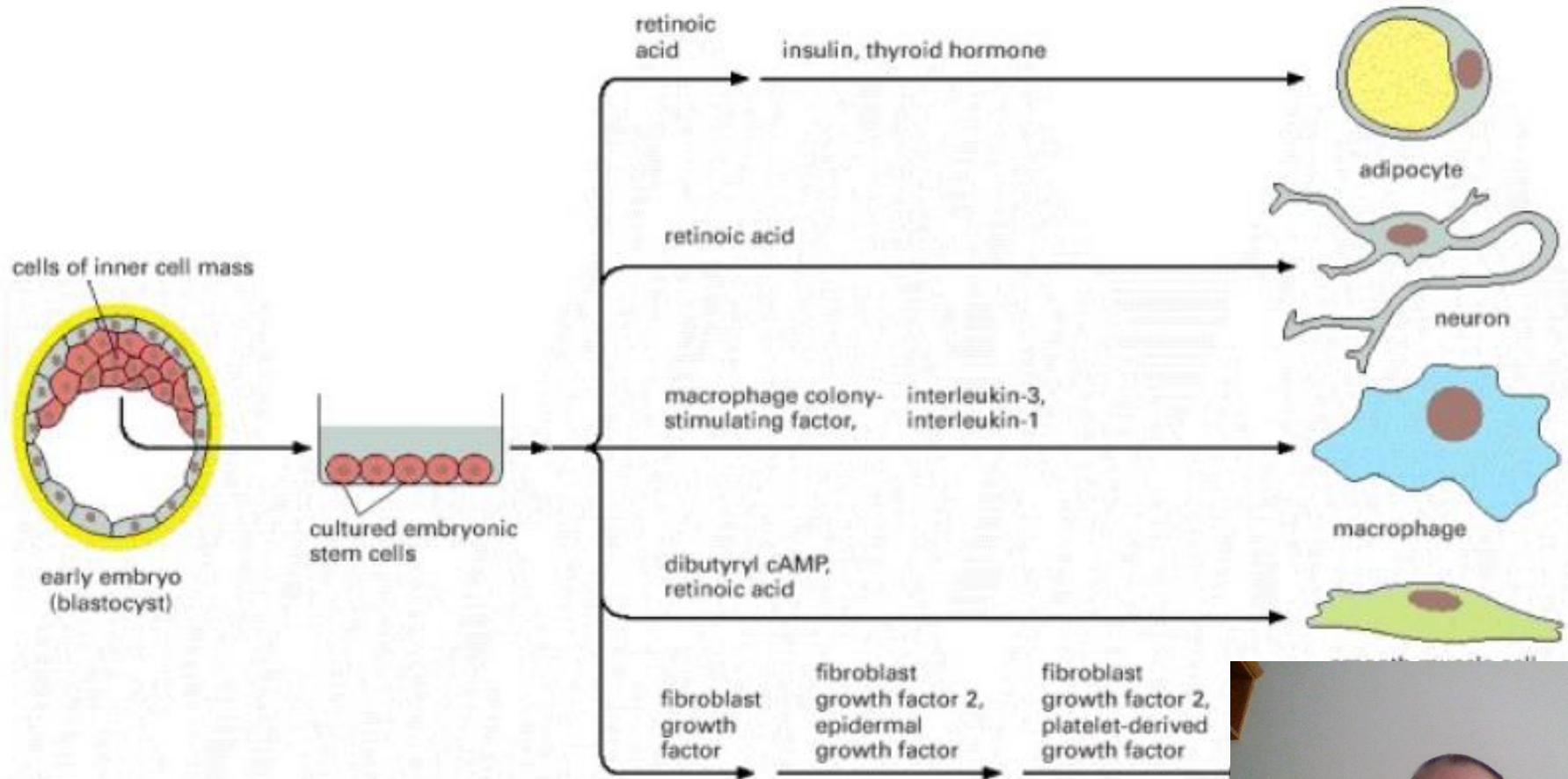
Genetikailag manipulálhatók (lásd előző óra, KO egér előállítás).

Megfelelő kezelésekkel különböző szöveti sejtekké differenciáltathatóak.



# Őssejtek, differenciáció

Az ES kultúra sejtjei megfelelő faktorok jelenlétében különböző típusú sejtekké differenciálthatóak.



# Differenciálódott sejtek újraprogramozása

A differenciálódott szomatikus sejtek általában nem képesek sejsorsuk megváltoztatására.

pl. neuronok nem alakulnak át spontán hepatocitákká.

Mi magyarázhatja ezt a berögzült állapotot?

- A differenciálódás során a sejt elveszít genetikai anyagot?  
(Weismann, 1893)
- A differenciálódás során megváltozik a gének transzkripció mintázata?  
(Epigenetikai tájkép, Waddington 1957)





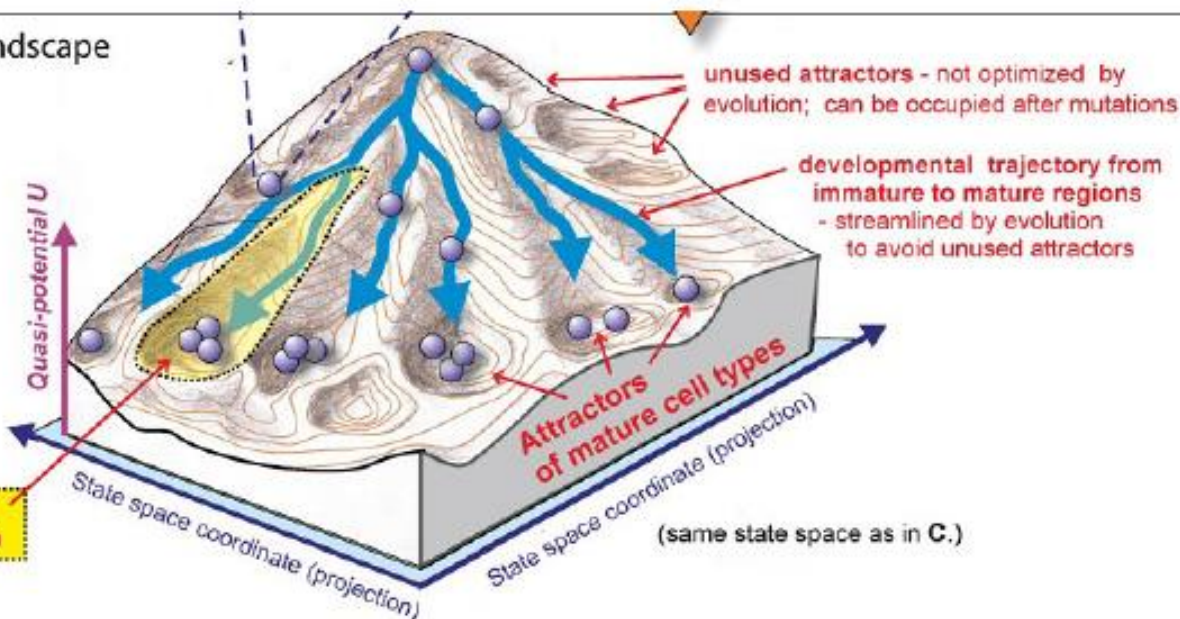
# Differenciálódott sejtek újraprogramozása

## Epigenetikai tájkép (Waddington, 1957)

A sejtek a differenciálódási utakon olyan stabil differenciálódott állapotokba kerülnek, amelyekből sem a visszafelé, sem egymás között nem lehetséges az átmenet.

Ez olyan domboldallal szemléltethető, ahol a sejteknek megfelelő golyók a differenciálódás során mélyebben fekvő, stabil állapotokba kerülnek. Sem a domboldalon felfelé, sem a gerinceken át a völgyek között nincs átjárás.

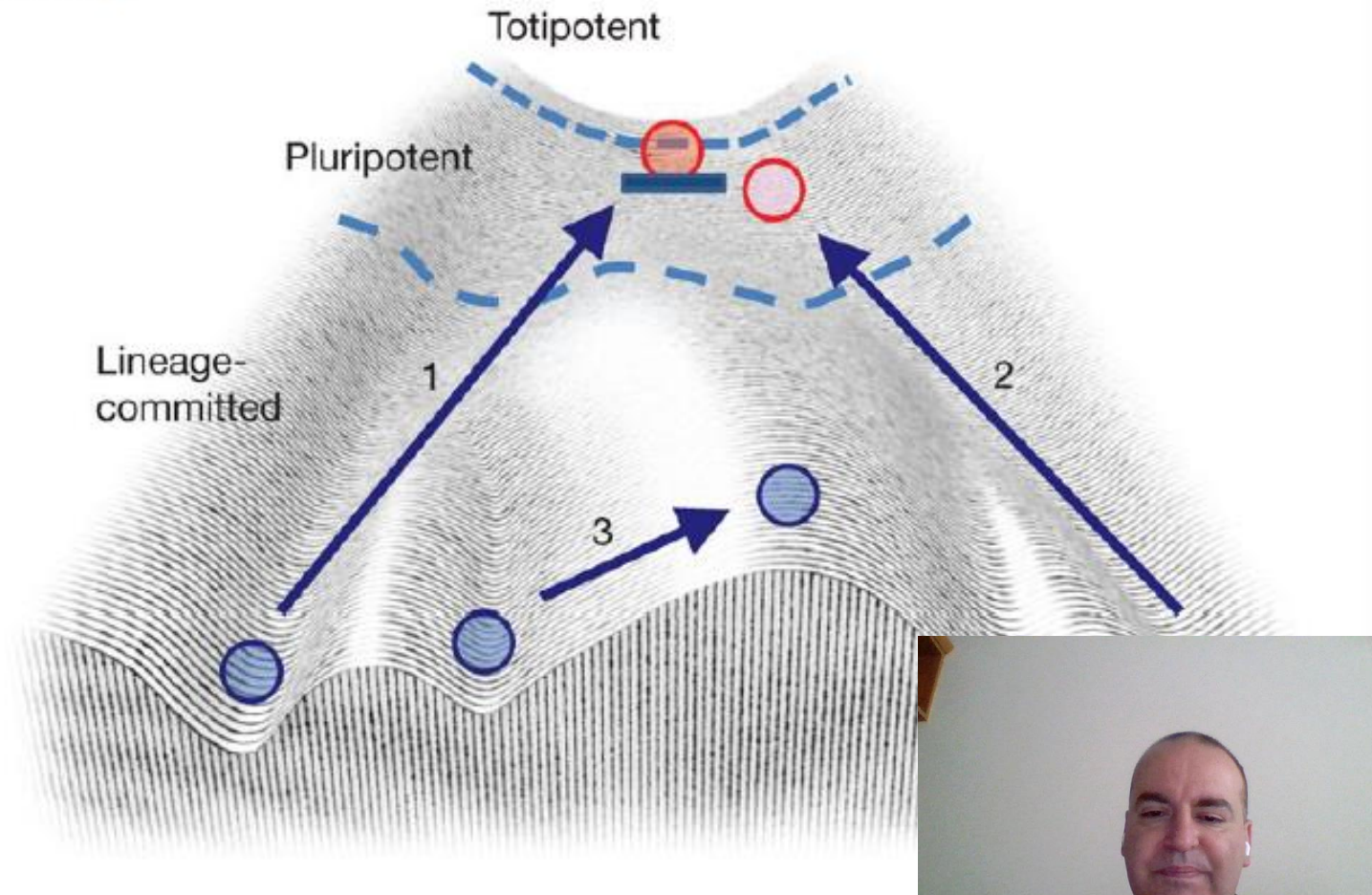
Epigenetic Landscape



# Differenciálódott sejtek újraprogramozása

Vagy mégis lenne átjárás?

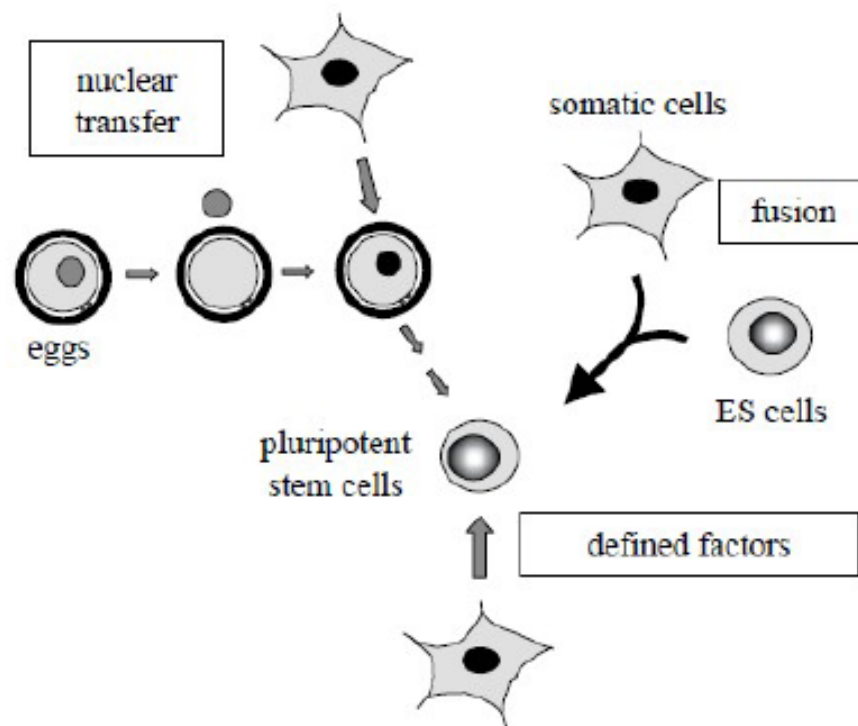
Hogyan valósítható meg?



# Differenciálódott sejtek újraprogramozása

Differenciálódott szomatikus sejtek pluripotenssé tételére három módszer áll rendelkezésre:

- Mag transzfer
- Sejtfúzió
- Transzkripciós faktor transzdukció



Ezekkel a módszerekkel a sejsors visszafordítható, a differenciált sejtek visszatéríthetők az embrionális sejtekre jellemző pluripotens áll

Ez bizonyítja, hogy a differenciálódás során (általában) nem ves

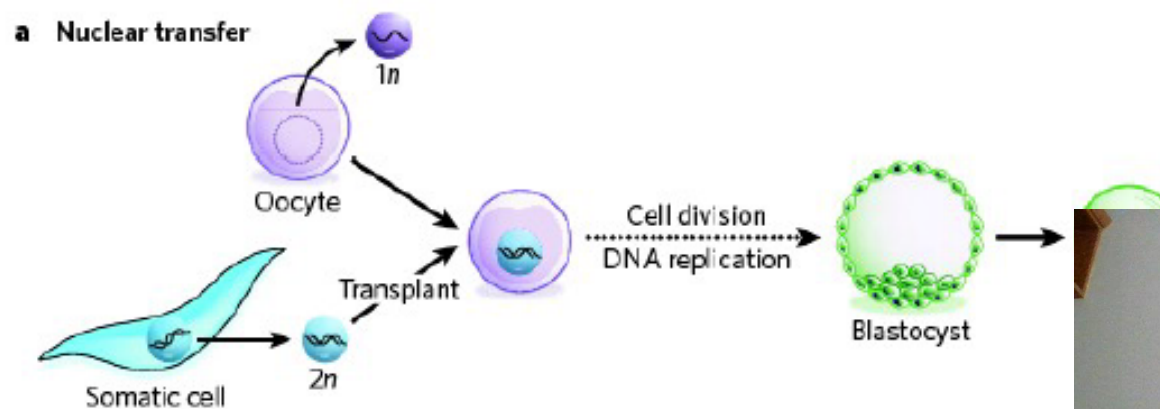
anyag.



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

A sejtmag transzfer során egy differenciált testi sejt magját transzplantálják egy enukleált petesejtbe.

Ebből a petesejtből a magot szolgáltató szomatikus sejttel genetikailag azonos egyed = klón fejlődik.



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

## 1952. Briggs és King:

*Rana pipiens* korai blasztocisztából származó sejtmag klónozásával sikerült létrehozniuk ebihalakat.

Differenciálódott sejtekből származó sejtmagokkal a kísérletet nem sikerült megismételni.

## 1962. John B Gurdon

*Xenopus levis* ebihal bélesejtéből származó magot ültetett UV-val enukleált petesejtekbe, amelyekből ebihalak és felnőtt békák is fejlődtek.

=> A sejt specializáció nem jár irreverzibilis genetikai változásokkal.

Sokáig kételkedtek Gurdon eredményeiben, mert

- Nem sikerült más fajban megismételniük
- Kis gyakorisággal (<1%) fejlődtek békák, lehet hogy ezek a sejt pluripotens szubpopulációjából származtak?



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

## Emlősök klónozása (SCNT - Somatic Cell Nuclear Transfer)

### 1983. McGrath and Solter

Egér létrehozása zigotikus donor mag enukleált zigótába juttatásával.

### 1997. Wilmut

Differenciált sejtől elsőként sikeresen klónozott emlős: Dolly a birka.

Stratégia: a klónozni kívánt emlő sejteket szérum megvonással G0 fázisba juttatták, majd elektromos impulzussal fúzionáltatták petesejttel.

### 2002. Jaenisch

Klónozott egér Ig átrendeződésen átesett B limfocitákból.

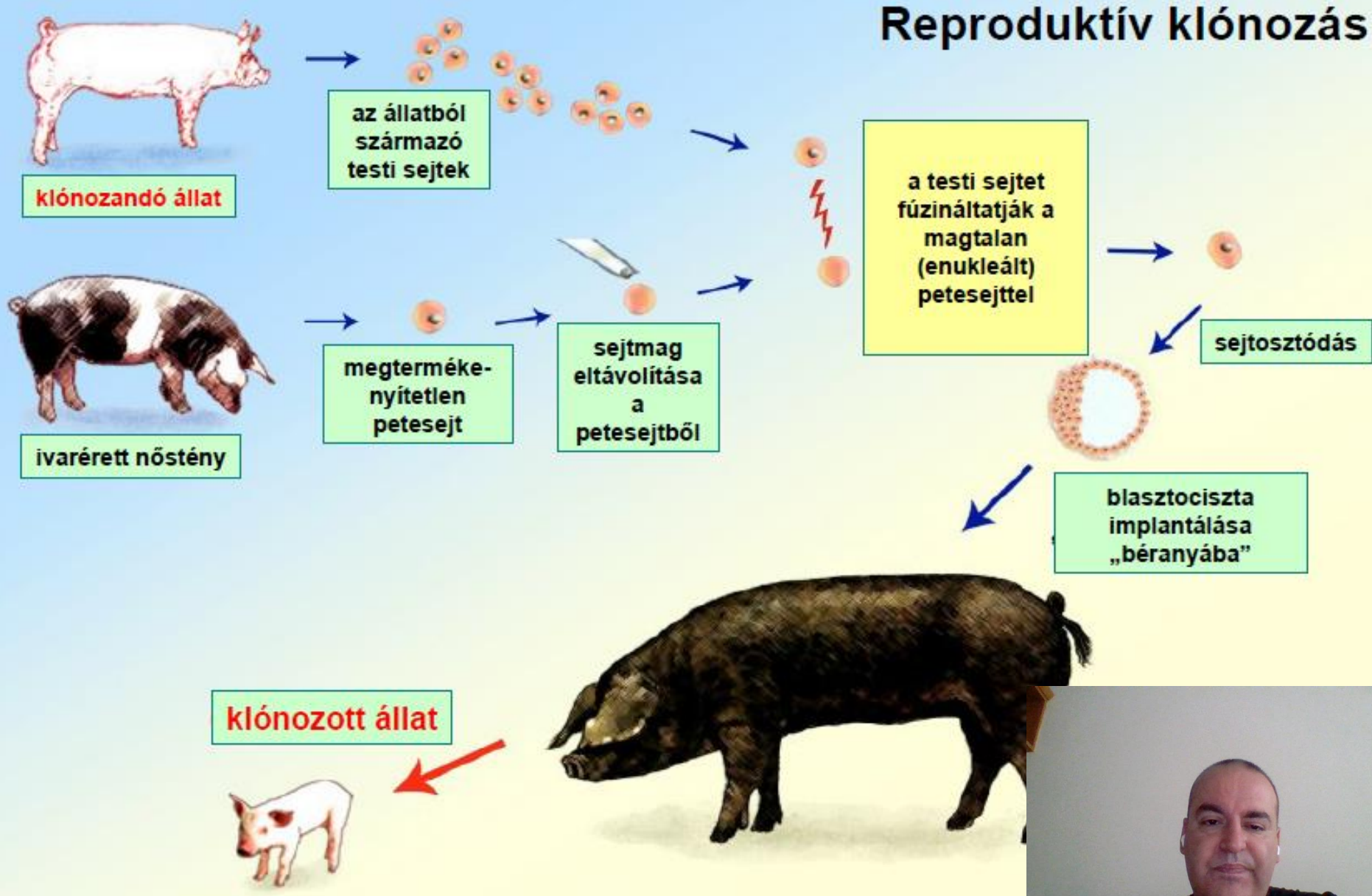
=> Ezzel végeleges bizonyítást nyert, hogy a klón differenciált sejtől származik, nem egy szöveti őssejtől.

=> A terminálisan differenciált sejtek minden gént tartalmaznak egyedfejlődéshez és ezek reaktiválhatók.

=> A petesejt tartalmaz olyan citoplazmatikus faktorokat, amelyek újraprogramozást végrehajtják.



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel



**Dolly**  
(1996.VII.5. – 2003.II.14.)





# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

1997 óta számos emlős fajt klónoztak (egér, kutya, macska, nyúl, stb).

## *Capra pyrenaica pyrenaica* (Pireneusi kőszáli kecske)

Az első kihalt fajból származó klónozott állat.

1999-ben vettek szövetmintát Celiából, a faj utolsó példányából.

2009-ben született meg az első klón (7 percig élt), béranyának házi kecskét használtak.

439 embrió

57 implantáció béranyába

7 vemhesség

1 utód



Celia, az utolsó Cpp  
1999-ben a mintavételkor



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

## A klónozás hatásfoka és hűsége

A klónozás általában alacsony (<1%) hatásfokú (lásd a kőszáli kecskés adatokat az előző dián).

Emellett a klónozott állatok gyakran szenvednek hasonló tünetektől (génexpressziós és telomer zavarok, immunológiai problémák, obezitás, tumorok, rövid élettartam).

A klónozás hatásfoka nagy mértékben növelhető (egér esetében ~1%-ról ~20%-ra), ha a szomatikus sejtmagot nem közvetlenül klónozzák, hanem ES állapoton keresztül.

Ez arra utal, hogy a mag újraprogramozása legtöbbször nem teljes jelek (DNS metiláció, hiszton módosítások, stb) maradhatnak hát



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

## Genetikai eltérések a szomatikus klón és a klónozott egyed között

### Mitokondriális genom:

a mitokondriumok saját örökítőanyaggal (cirkuláris DNS) bírnak  
humán mitokondriális genom: 16 kb, 37 gén (2 rRNS, 22 tRNS, 13 fehérje kódoló)  
a mitokondriumokat a béranya petesejtje adja !!!

### Telomerek:

a szomatikus sejtek kromoszómáinak vége a sejtosztódások során megrövidül (nincs telomeráz aktivitás)

### Szomatikus mutációk:

a magot adó testi sejtben felhalmozódott szomatikus mutációk minden sejtjét érinteni fogják



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel



**ENSZ 2003: a humán klónozás minden olyan formájának tiltása, amely összeegyeztethetők az emberi méltósággal és az emberi élet**



# Újraprogramozás sejtmag transzferrel

A klónozás célja szerint lehet

- reprodukzív
- terápiás

Emberek esetében etikailag mindkettő problémás.

Etikus-e klónozással utódokat létrehozni?

A klónozott embriókból kinyert genetikailag azonos ES sejtek hasznosak lehetnek terápiás célból. De etikus-e azért embriókat létrehozni, hogy szövetpótlásra használják fel őket?

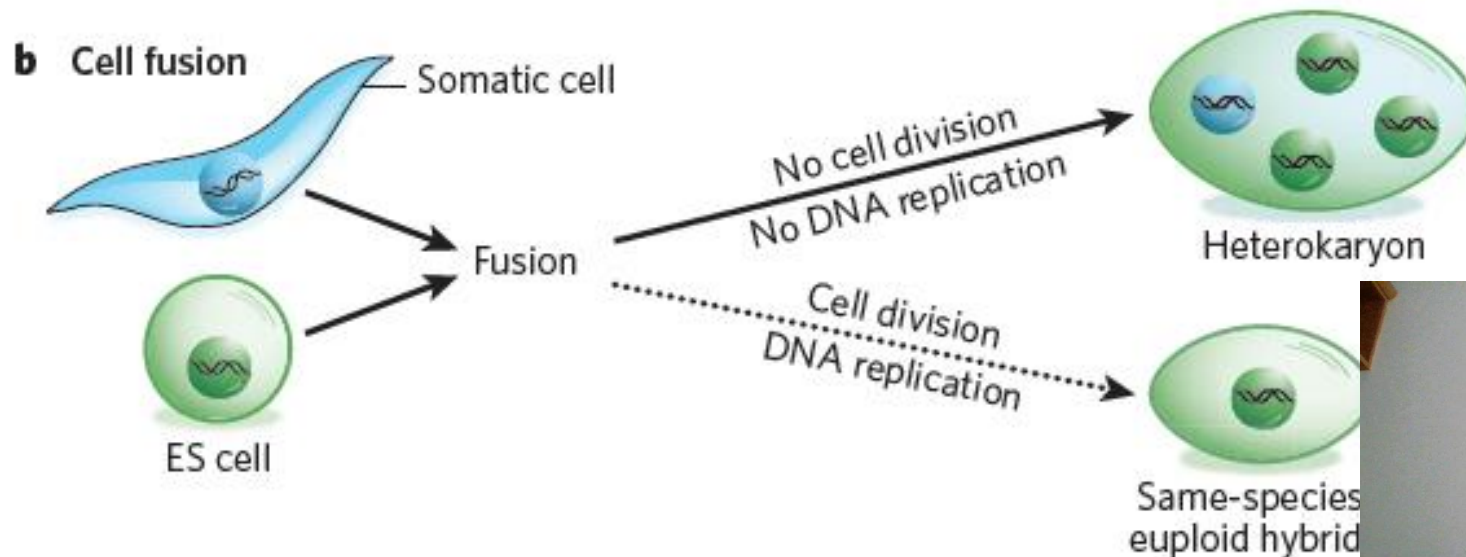


# Újraprogramozás sejtfúzióval

A sejtfúzió során a két genom és citoplazma egymásra gyakorolt hatása megfigyelhető. Ez a módszer így hozzájárult a transz hatású transzkripciós faktorok és tumor szuppresszorok felfedezéséhez.

A sejtfúzióval létrejöhet:

- heterokarion (a magok nem fuzionálnak, nem osztódik)
- hibrid (a magok fuzionálnak, osztódik)



# Újraprogramozás sejtfúzióval

A hibridek között könnyebb változásokra szelektálni (mivel osztódnak), de kromoszóma átrendeződések, eltérő fajok hibridje esetén aneuploidia esélye fennáll.

1983-ban mutatták ki először eltérő fajokból képzett heterokarionban, hogy kikapcsolt gének újra aktiválódhatnak. => újraprogramozás

pl. egér izom sejtek és emberi fibroblaszt sejtek heterokarionjában emberi izomra jellemző gének aktiválódtak

Ezzel a módszerrel mindhárom csíralemezből származó sejtfeleségben sikerült izomra jellemző géneket aktiválni.



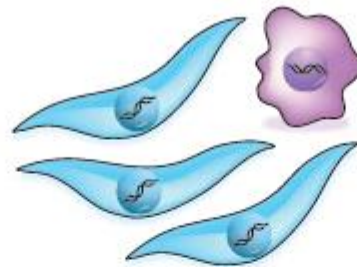
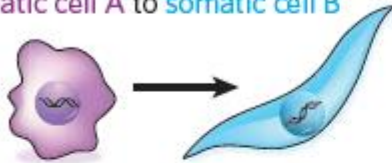
# Újraprogramozás sejtfúzióval

Az újraprogramozás irányát a sejtmagok aránya (azaz a géndózis) határozta meg.

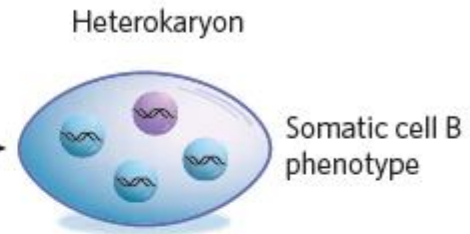
=> szabályozó faktorok dinamikus egyensúlya tartja fent az adott differenciálódott állapotot

Directed reprogramming and gene discovery by fusing cells of different species in heterokaryons

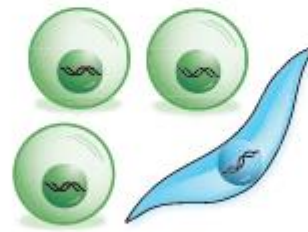
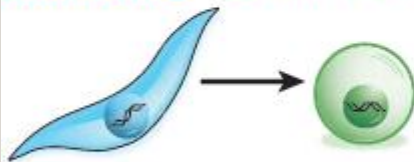
Directed reprogramming of somatic cell A to somatic cell B



Fusion



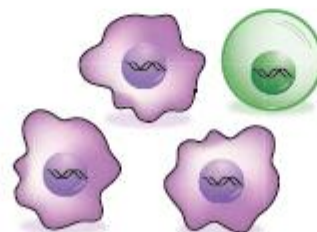
Directed reprogramming of somatic cell B to ES cell or iPS cell



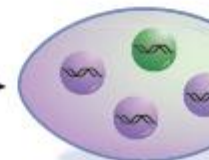
Fusion



Directed reprogramming of ES cell or iPS cell to somatic cell A



Fusion





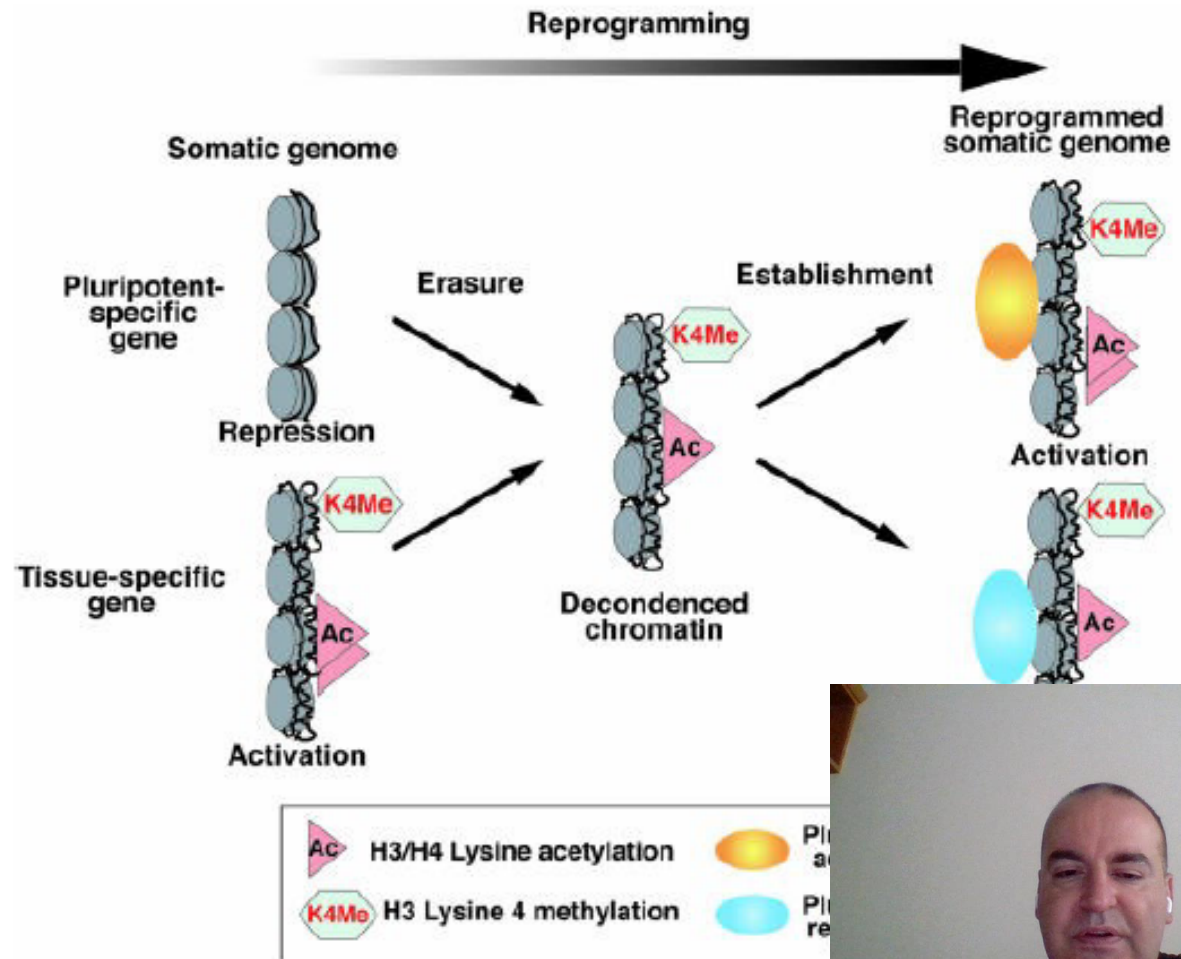
# Újraprogramozás sejtűzióval

Szomatikus sejtek és ES sejtek fúziójával sikerült pluripotencia gének indukcióját kimutatni a szomatikus sejtől származó genomban.

pl. *Mus musculus domesticus* ES sejtek és *Mus musculus colossinus* tímusz sejtek fúziója után a szomatikus eredetű *M. m. colossinus* genomban

- H3 és H4 hisztonok hiperacetylációját
- H3K4 lizin fokozott di- és triemetilációját

tudták kimutatni



# Újraprogramozás sejtfúzióval

Szomatikus sejtek és ES sejtek fúziójával létrehozott hibridek felhasználhatók a pluripotencia kialakításához / fenntartásához szükséges faktorok azonosítására.

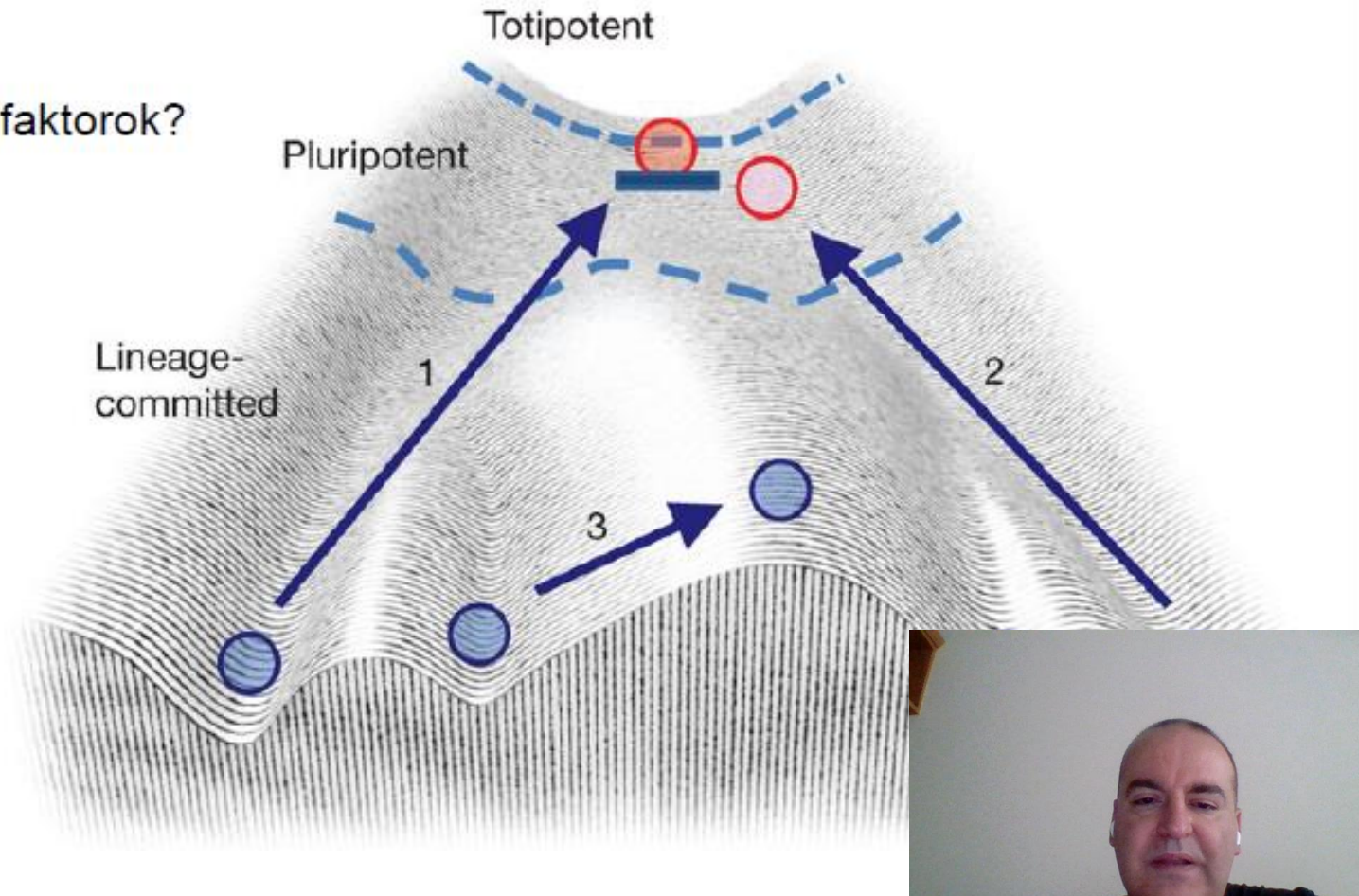
1. Transzkriptomikai analízissel (cDNA microarray, RNA-seq) a szomatikus sejtmagban indukálódó ill. represszálódó gének azonosíthatók.
2. Kromatin analízissel (ChIP, meDIP, stb) a kromatin szerkezetben bekövetkező változások vizsgálhatók (lásd előző dia).
3. Mutációs analízissel megállapítható, hogy egy gén szerepet játszik-e a pluripotens állapot kialakításában.  
pl. *Oct4* mutáns egér ES sejtek és humán B sejtek fúziója nem eredményez pluripotens sejteket => az *Oct4* gén terméke szükséges az átprogramozáshoz



# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval

A sejtmag transzfer és sejtfüziós eredményekből már láthattuk, hogy az ES sejtek citoplazmája tartalmaz olyan faktorokat, amelyek képesek a szomatikus sejt újraprogramozására.

De melyek ezek a faktorok?



# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval

Korábbi vizsgálatok kimutatták, hogy egyedi transzkripciós faktorok is képesek a sejtors megváltoztatására.

1987. Schneuwly: *Antennapedia* gén túltermelése *D. melanogaster*ben



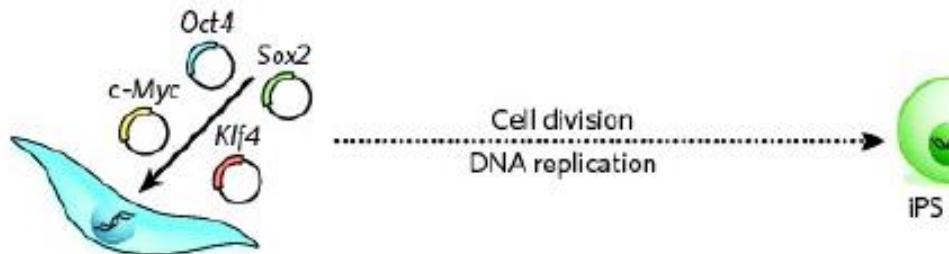
(a) Normal fly



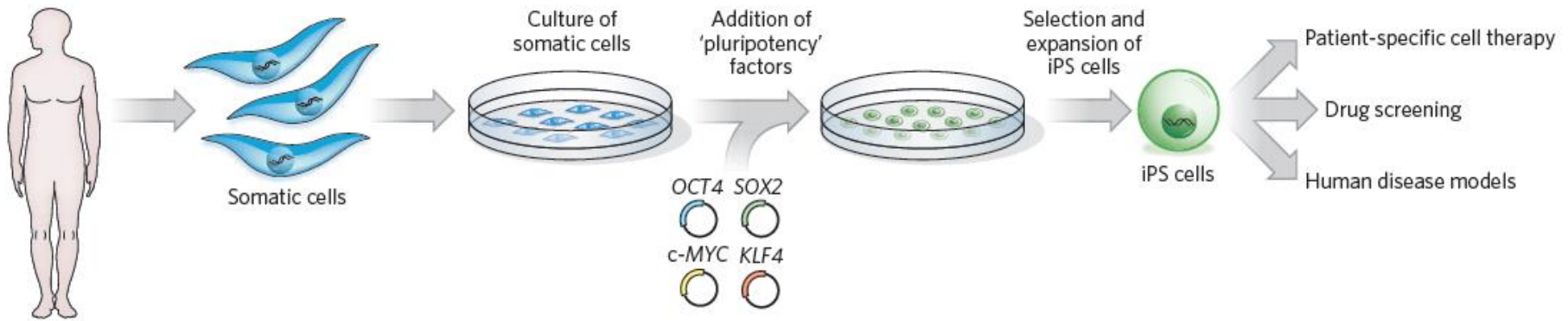
(b) Mutant fly

Yamanaka és munkatársai 2007-ben kimutatták, hogy 4 faktor transzdukciója elegendő indukált pluripotens őssejtek (iPS) létrehozásához.

## c Transcription-factor transduction



# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval



Yamanaka 24 a pluripotenciában feltételezetten szerepet játszó gént vizsgált.

Egér fibroblaszt sejteket transzdukált szimultán a 24 faktort tartalmazó mini cDNS könyvtárral (retrovírus vektorban).

Riporterként a csak pluripotens sejtekben expresszálandó *Fbx15* génbe inszertált neomicin rezisztencia gént használtak => G418 (geneticin) tartalmú táptalajon csak a pluripotens sejtek éltek túl.

A 24 faktor együtt létrehozott pluripotens sejteket, amelyek egér (mind a 3 csíralemeznek megfelelő sejtet tartalmazó tumor) kép

A faktorok sorozatos eliminációjával azonosította az újraprogramozás minimálisan szükséges kulcsfaktorokat: OCT4, SOX2, KLF4, c-M



# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval

## OCT4:

ES sejtekben, korai embriókban és ivarsejtekben expresszáldó, POU családba tartozó transzkripciós faktor.

Egér *Oct4* null mutánsok korai embrióként elpusztulnak, csak trofoblaszt sejteket hoznak létre. Humán ES sejtekben *Oct4* siRNS csendesítése trofoblaszt sejtekké differenciálja őket. Túlermelése endodermális és mesodermális differenciációt eredményez.

## SOX2:

ES sejtekben, korai embriókban, ivarsejtekben és idegi őssejtekben expresszáldó, Sox (SRY-related HMG-box) családba tartozó transzkripciós faktor.

Sox2 null embriók korán elpusztulnak, ektoderma nem alakul ki. In vitro kulturált Sox2 null blasztociszták trofektodermális és endo szövetekké differenciálódnak.



# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval

## **KLF4:**

Kruppel-like transzkripciós faktor, expresszálódik egér ES sejtekben. Tumor szuppresszor de onkogén hatás is: deletált gasztrointesztinális tumorokban; túltermelt mellrákban.

Ektopikus expressziója szuppresszálja a sejt proliferációt.

## **C-MYC:**

Helix-loop-helix/leuzin zipper transzkripciós faktor, proto-onkogén.

Túltermelve fenntartja ES sejtek pluripotens állapotát, domináns negatív c-Myc expressziója differenciációt eredményez.

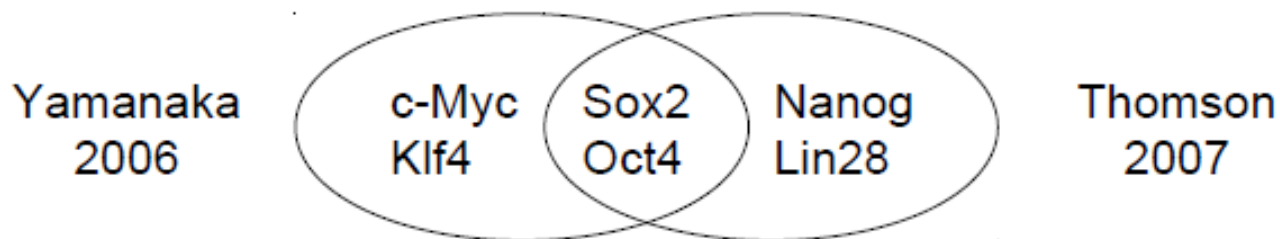


# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval

Az így előállított iPS sejtekből származó egerek sterilek volt.

Eltérő szelektációs gén választásával (*Fbx15* helyett *Nanog*) ez a hiba orvosolható volt.

Későbbi kísérletekben más, részben átfedő faktorokkal is sikerült iPS sejteket létrehozni.



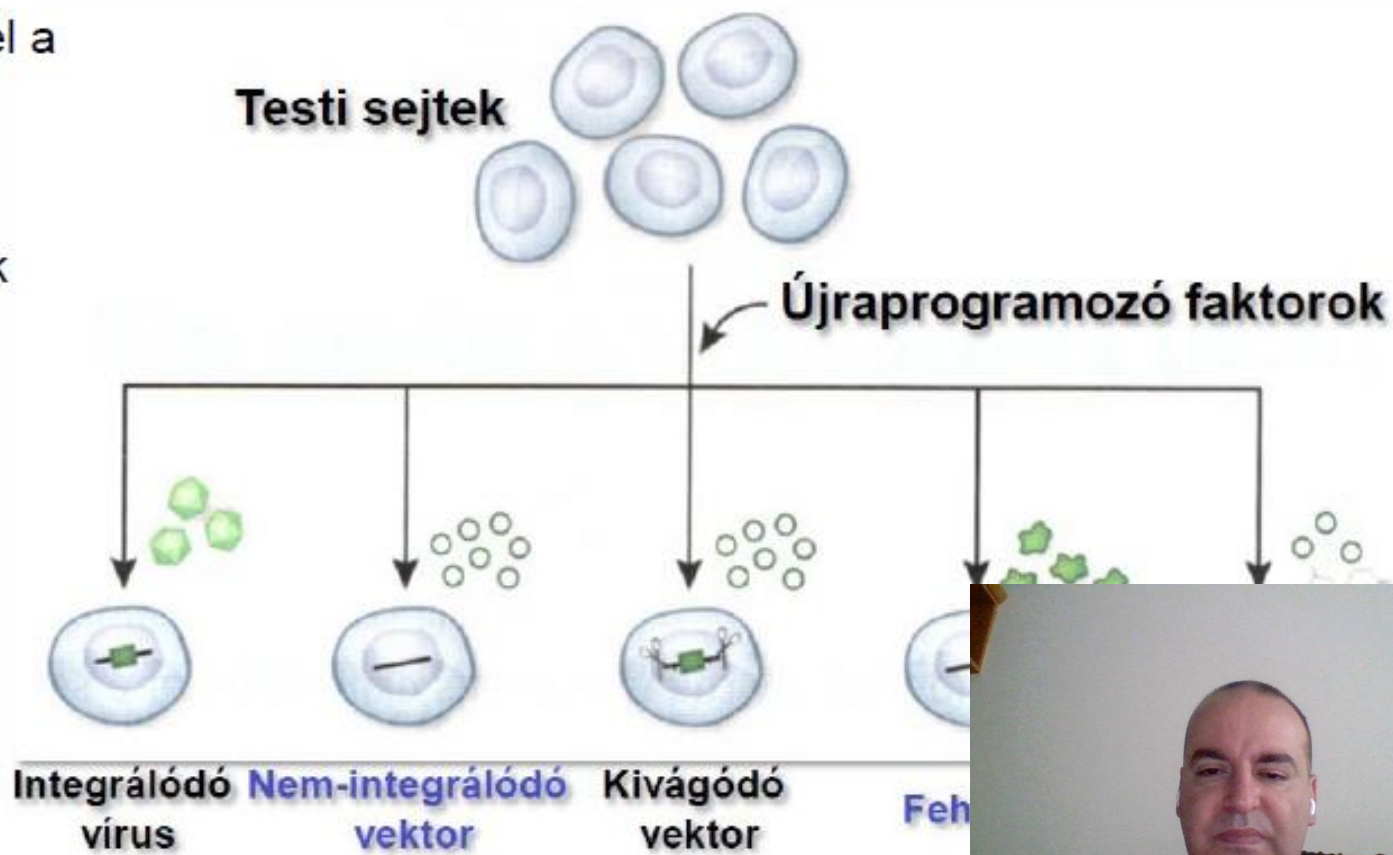


# Újraprogramozás transzkripció faktor transzdukcióval

A négy transzgénnek csak a pluripotencia kialakítása során kell jelen lennie (az eredeti kísérletben használt MMLV vektorok inaktiválódtak), a szerepüket ez után az aktiválódó endogén gének átveszik.

Új módszerek, mivel a retrovírusok:

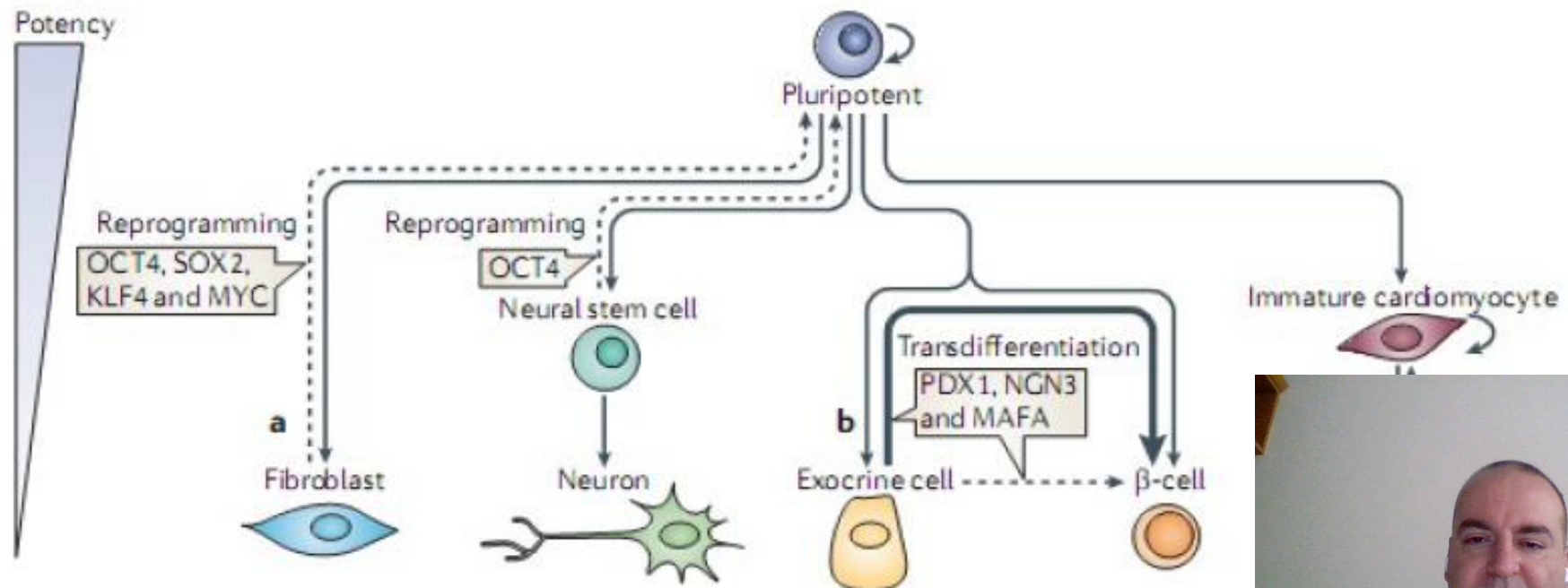
- integrálódnak
- tumort okozhatnak
- leaky expresszió



# Újraprogramozás transzkripciós faktor transzdukcióval

A differenciált állapot megváltoztatásának három típusa van:

- Újraprogramozás: differenciált sejtből pluripotens sejt
- Transzdifferenciáció: egyféle differenciált sejtből másféle differenciált sejt
- Dedifferenciáció: terminálisan differenciálódott sejt visszaalakulása azonos differenciálódási vonalon belüli korábbi állapotba



# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása

A leggyakoribb, rutin őssejt terápia a csontvelő átültetés (HSCT, Hematopoietic stem cell transplantation)

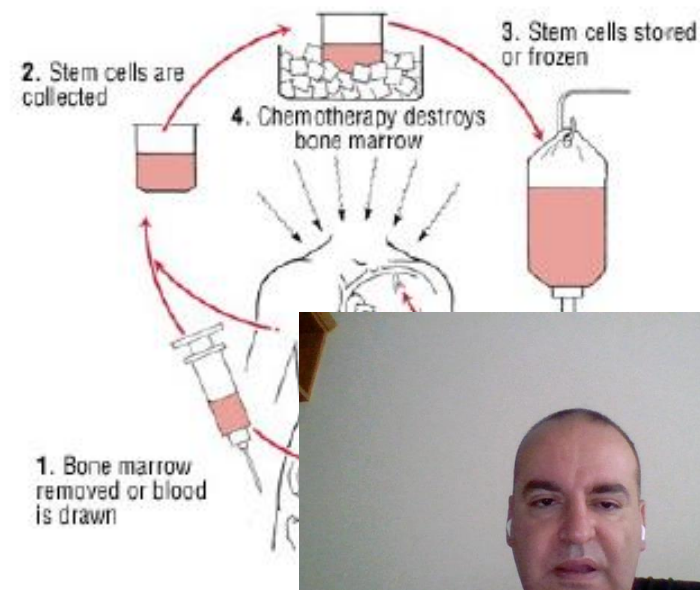
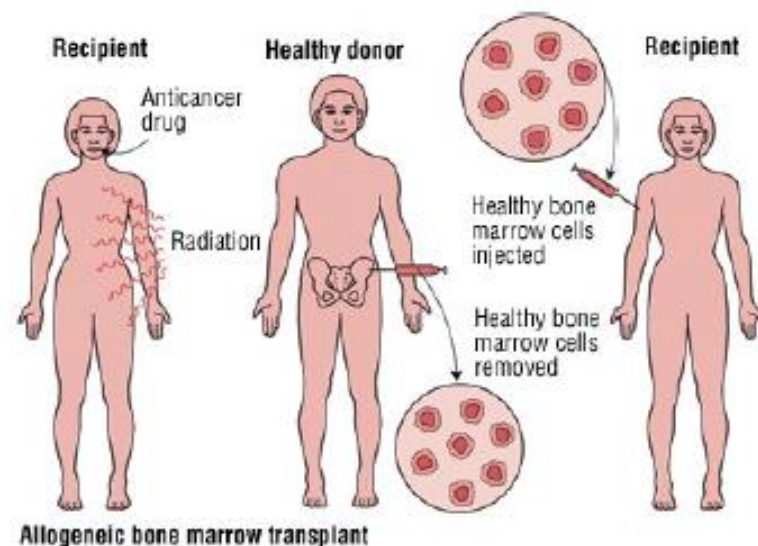
Leukémia, thalasszémia stb kezelésére.

Első alkalmazás: 1959, George Mathe, 5 sugárfertőzött jugoszláv bányászon (mind kilökődött)

1990 E Donnall Thomas: élettani Nobel (megosztva JE Murray-vel)

"organ and cell transplantation in the treatment of human disease"

A graft-versus-host reakció (kilökődés) leküzdésében/vel értek el áttörést

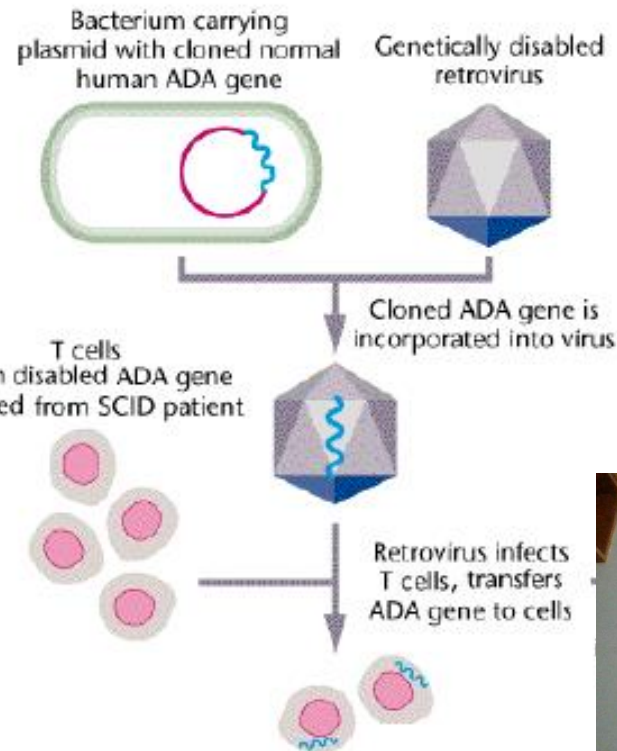


# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása



SCID (Severe Combined ImmunoDefficiency)  
„bubble boy disease”

T limfociták hiánya, a legsúlyosabb  
veleszületett immundefektus



(Klug & Cummings 1997)



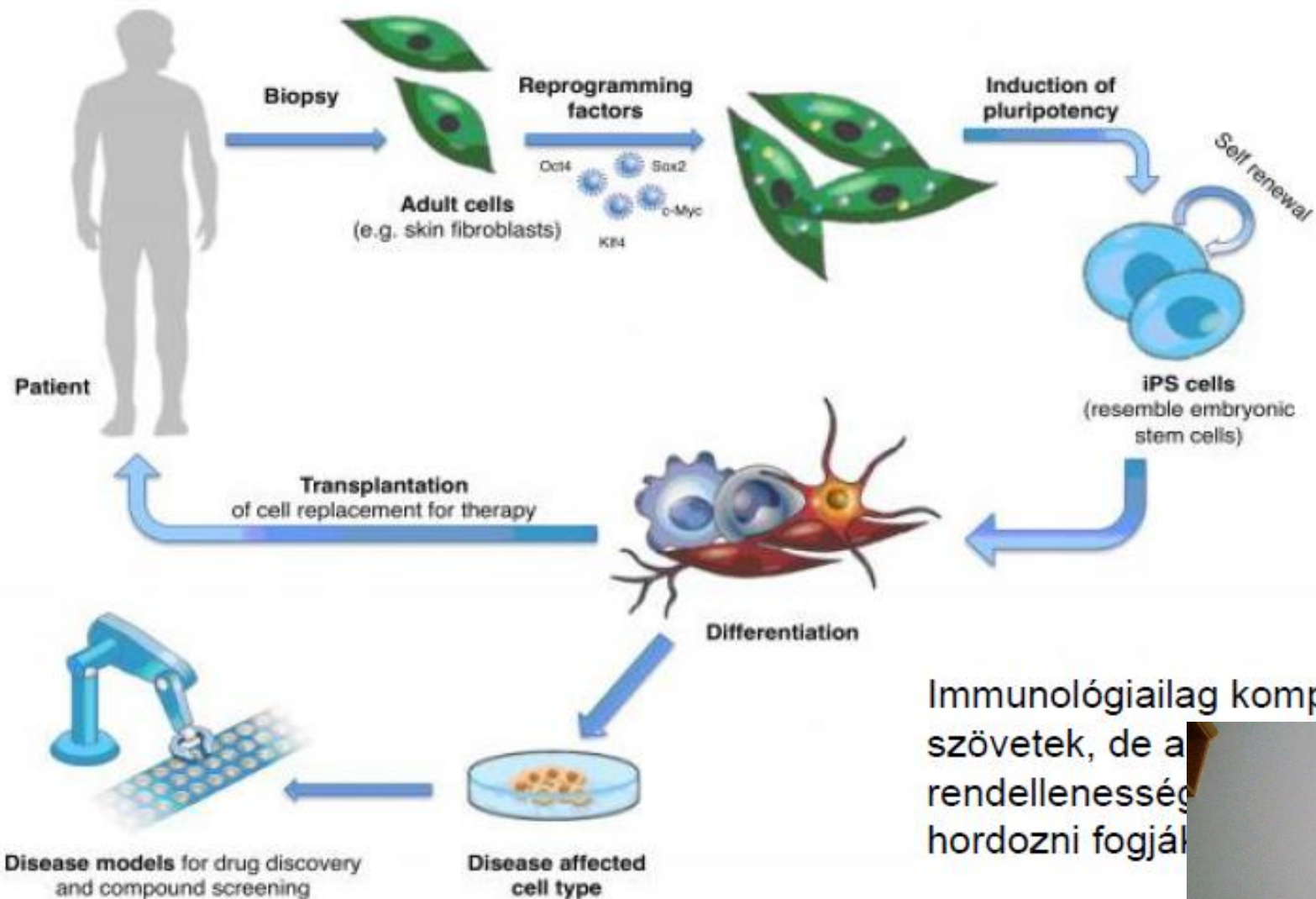
Genetically altered cells are reimplanted, produce ADA

Az első génterápia, 1999 óta  
17 beteg immunrendszerét  
állították helyre.

De közöttük gyakran előfordult  
leukémia a retrovírus vektor  
integrációja miatt.



# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása



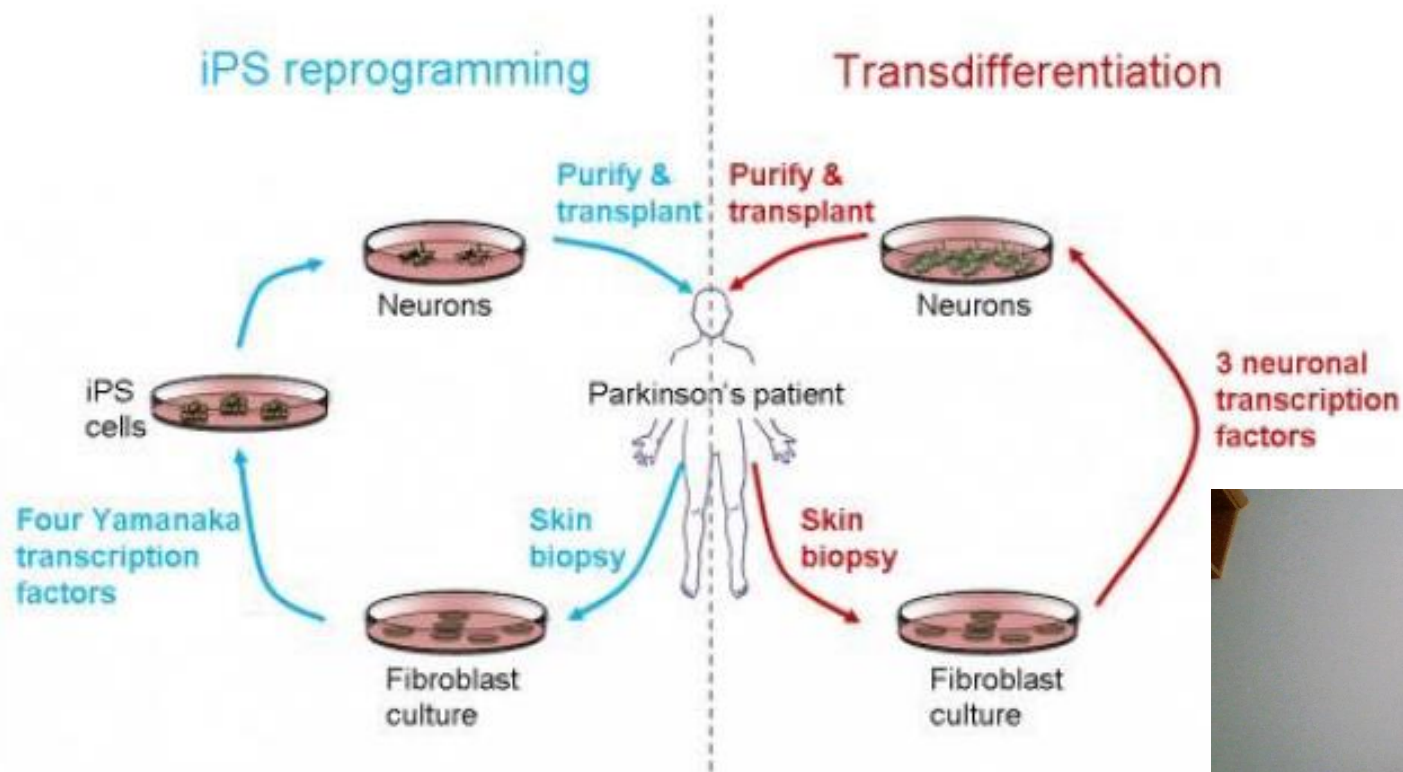
Immunológiailag kompatibilis szövetek, de a rendellenesség hordozni fogják



# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása

A transzplantálandó sejtek előlíthatóak iPS újraprogramozással, vagy transzdifferenciációval is.

A pluripotens sejtek veszélyt is rejtenek magukban, mivel nem teljes differenciálódás esetén a transzplantáció után teratómákat képezhetnek.

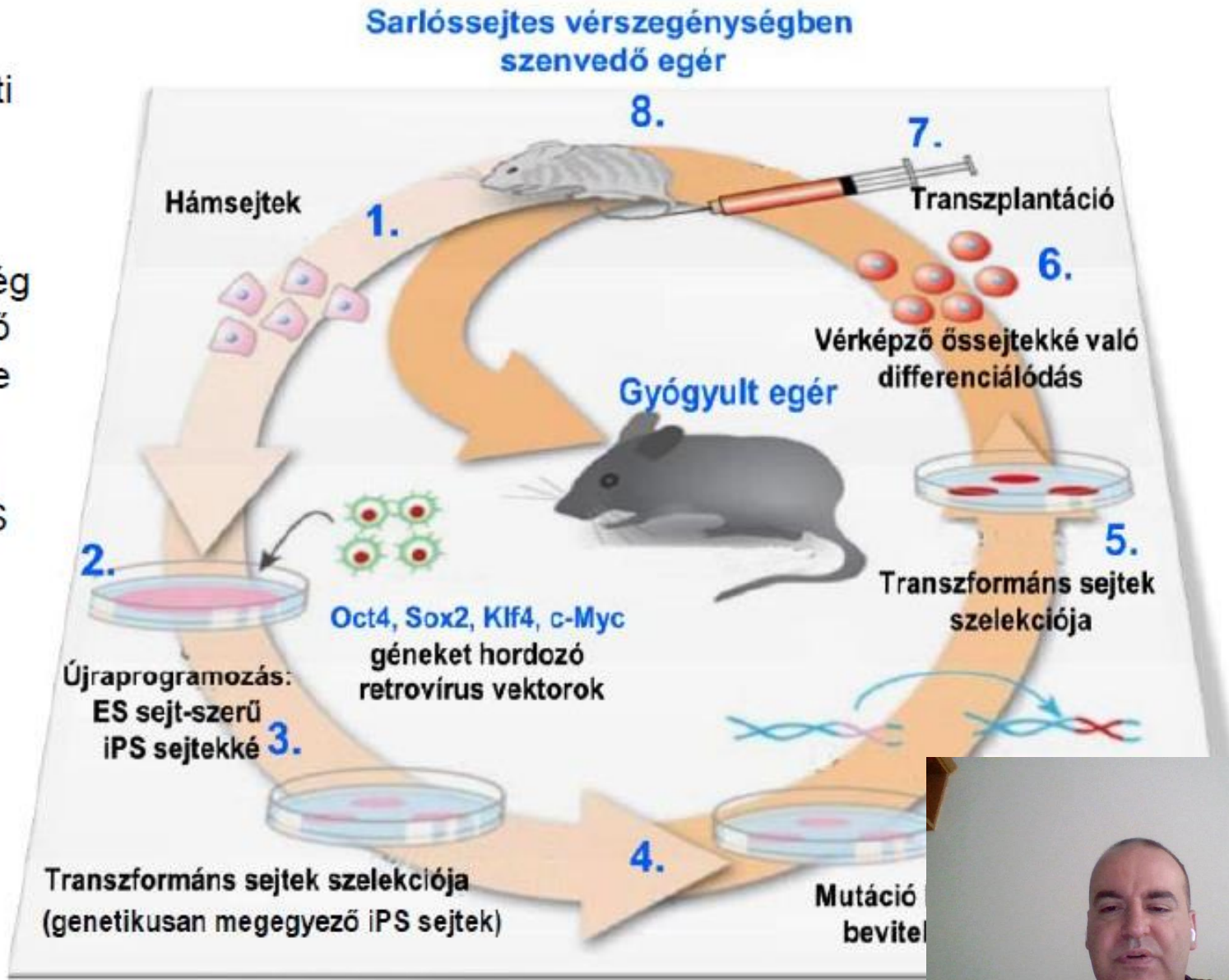


# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása

Egy gyakorlati példa:

Sarlósejtes vérszegénységben szenvedő egér kezelése autológ bőrsejtekből származó iPS sejtekkel

Hanna et al, 2007

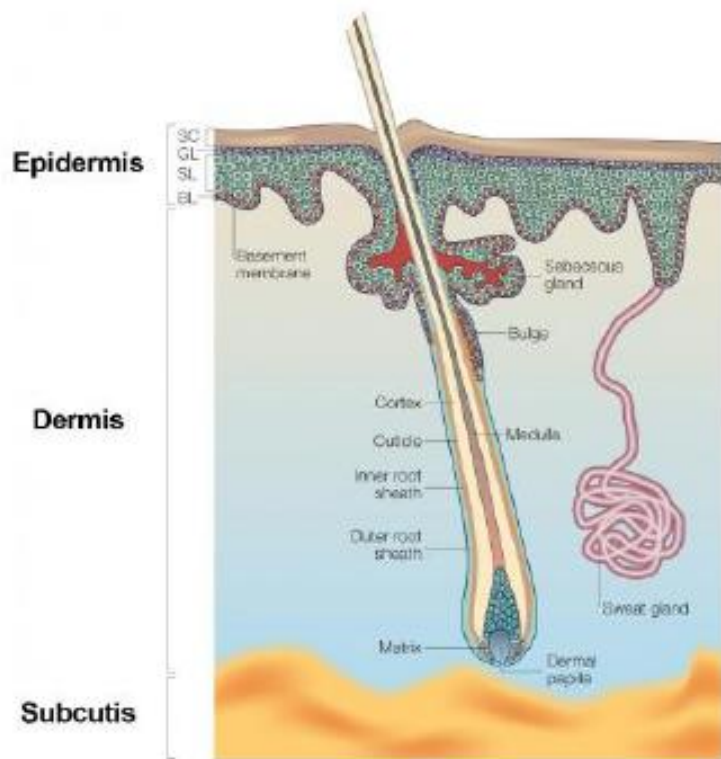


# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása

Sokrétű funkciójának megfelelően a bőr legalább négyféle szomatikus őssejt típust tartalmaz:

epidermisz őssejtek, hajhagyma follikuláris őssejtek, melanocita őssejtek, mesenchimális őssejtek.

Laboratóriumi körülmények között keratinociták differenciációjával mesterséges bőr képezhető.

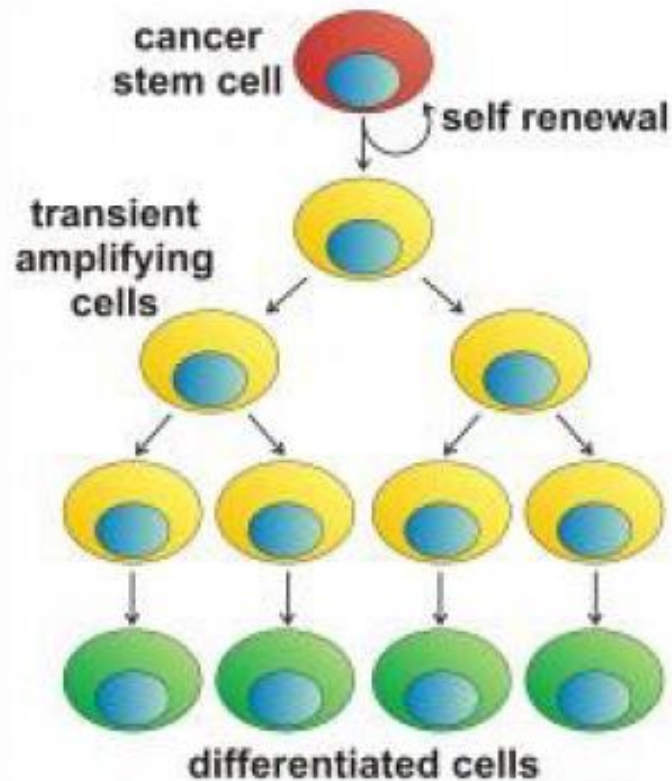




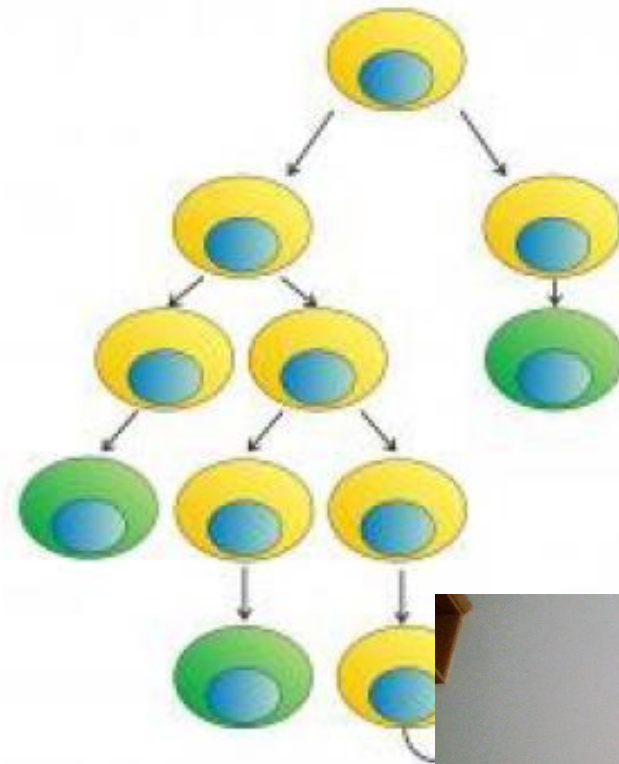
# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása

## Tumor őssejt modell

The cancer stem cell model



The stochastic model



# Őssejtek, iPS sejtek felhasználása

