

Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen

Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



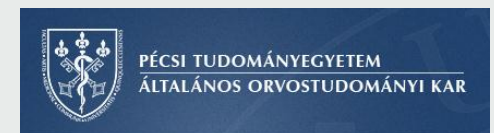
MAGYARORSZÁG MEGÚJUL

Az orvosi biotechnológiai mesterképzés megfeleltetése
az Európai Unió új társadalmi kihívásainak
a Pécsi Tudományegyetemen és a Debreceni Egyetemen
Azonosító szám: TÁMOP-4.1.2-08/1/A-2009-0011



Dr. Balogh Péter és Dr. Engelmann Péter
Transzdifferentiáció és regeneratív medicina – 10. előadás

TRANSZDIFFERENCIÁLÓD ÉS A KÖZPONTI IDEGRENDSZERI REGENERÁCIÓBAN



Neurogenézis a *Drosophila*-ban és az emlősökben

- A *Drosophila* neurogenézise során a neuroblasztok (NB) összejt-szerűen osztódnak, így egy újabb neuroblasztot és egy differenciálódó ganglion anyasejtet (GMC) hoznak létre. A GMC sejt egy olyan köztes előalak, amely általában egy végleges osztódás után két poszt-mitotikus neuront hoz létre.
- Az emlős neurogenézis során a 'multipotens' neurális összejt (NSC) képes arra, hogy az idegrendszer minden sejtípusát kialakítsa.
- A neurális összejt neurális progenitorokat hoz létre, melyek már elkötelezett progenitorokat alakítanak ki, ezen előalakokból differenciálódott neuronok jönnek létre.

A neurális plaszticitás megállapításának kritériumai

- Sejt-specifikus neurális markerek azonosítása (pozitív neurális markerekre, negatív glia markerekre)
- Neurális fehérjék és transzkriptumok indukciója
- Funkcionális karakterizálás membrán/akciós potenciál elektrofiziológiával, szinapszis létrehozása, neurotranszmitter kibocsátás
- Specifikus neurális markerek in vivo expressziója, funkcionális karakterizálás és a neurális szabályozó rendszerekbe való beintegrálódás.

Érett neurális őssejtek

- Az érett idegrendszerben nem képződnek új neuronok.
- Bár új adatok arra mutatnak rá, hogy a madarak (énekesmadarak) viszonylag nagy neuronális plaszticitással rendelkeznek (neurális őssejtek).
- További új adatok BrdU inkorporációs kísérletek során azt bizonyították, hogy emberi agyban is vannak újonnan képződött neuronok.
- Ezen új neuronokat képző őssejtek az ependimában találhatóak.

A emlős neurális őssejtek lokalizációja

Érett emlős agyban két fő germinatív régió van jelen:

- az oldalsó agykamra szubventrikuláris zónájában
- a hippocampus dentát gyrus subgranuláris sejtes rétegében

Közvetlen neuronális differenciáció

Három fő megközelítés lehetséges, emberi ES sejtekből neurális előalakokat (hNP) hozzunk létre:

- A humán ES sejt kolóniák neurális differenciálódásának direkt elősegítése
- Humán ES sejtek stromális „feeder” sejtekkel történő együttes tenyésztése
- Többlépéses protokoll során embrionális testecskék létrehozásával.

Közvetlen neuronális differenciáció

- Az embriogenezis során, a neuruláció a legelső a szervképződés lépései közül.
- Humán ES sejtek képesek spontán, közvetlen módon idegsejteké differenciálódni. Humán ES sejtek hosszú távú kultúrája, „feeder” sejt csere nélkül indukálja az ektodermális származékok képződését.
- Szérummentes környezetben és morfogének adása nélkül az ES sejtek homogén neuroepitélialis sejtekké differenciálódnak.
- Ez a differenciálódási folyamat 2 hét alatt zajlik le, és ez megfeleltethető a humán embrióban történő neurális lemez/neurális cső fejlődésének.
- hES sejtek differenciálódása NP-á megtörténik ha nagy koncentrációjú BMP inhibitorokkal (Noggin vagy dorsomorfin) kezeljük a tenyészetet.
- Jelenleg egy „feeder”-mentes hES neurális indukáló rendszert dolgoztak ki párhuzamos BMP jelátviteli útvonal gátlók és aktivin/nodal/TGF- β inhibitorok (i.e. SB431542) együttes adásával, mely homogén hNP sejtek képződését eredményezi.
- A SMAD jelátviteli út kettős gátlása kontrollált konverzió segítségével a neurális progenitorok homogén populációját képi, mely egy vonzó megközelítés lehet mind az alap és az alkalmazott kutatások számára is.

Stromális sejtek és hES sejtek közös tenyésztése *in vitro*

- A stromális sejtek laza rostos kötőszöveti sejtek, melyek számos szövetben megtalálhatóak mint pl. a nemi szervekben és csontvelőben.
- A szervekben támasztékul szolgálnak más sejtek számára. A hES sejtek együttes tenyésztése stromális sejtekkel elősegíti a hES neurális sejtekké történő differenciálódását.
- Ezen sejtek olyan kevésbé ismert faktorokat termelnek/szekretálnak, amelyek elősegítik a neurális rosetták képződését, ezt együttesen „stromális sejt-eredetű indukáló aktivitás”-nak nevezzük.
- Ez a ko-kultúra azon a tényen alapul, hogy a neurális differenciálódásban mezodermális jelek is részt vesznek, melyet kísérletesen sikerült bizonyítani egér és majom ES sejtek neuronális differenciálódása során.
- Habár ez a módszer hatékonyan elősegíti a hES sejtek neuronális differenciálódását ez a modell nem alkalmas a neuronális differenciálódás molekuláris mechanizmusainak vizsgálatára mivel a stromális sejtek által szekretált faktorok sejtenként változhatnak.

Embrioid „testecske” létrehozása

- A hES sejteket embrioid testecskek létrehozása után neurális irányba lehet differenciáltatni.
- Ha hES sejteket differenciáltatunk szuszpenzióban, egy 3D aggregátumot hoznak létre, melyet embrioid „testecskének” (embryoid body, EB) nevezünk. A neuronális differenciálódás elősegítése érdekében és a kívánt sejtípusok túlélése érdekében növekedési faktorokkal vagy morfogénekkal kel kiegészíteni a tenyésztő médiumot.
- EB kultúra számos hátrányt hordoz magában: (1) méretileg igen változatosak (ez betudható a kiindulási sejtszámbeli különbségeknek vagy a differenciálódás időtartamának) (2) a morfogének koncentrációbeli különbségei az EB különböző rétegeiben egy koncentráció grádienszt hoz létre, mely a sejtek különböző fejlődési stádiumát fogja eredményezni a szöveti rétegekben (3) a differenciálódás során az EB-ben aggregálódo sejtek megakadályozzák a sejtek morfológiájának a nyomon követését.
- Jelenleg új protokollokat dolgoztak ki arra, hogy a hES sejtekből eredeztetett EB-k rövid távú tenyésztése ill. az adherens kultúrák közvetlen differenciáltatása lehetővé váljon. Ez a továbbiakban egy jól kontrollált lépésről-lépésre haladó differenciálódást tesz lehetővé a hES-ből létrejövő hNP részére.

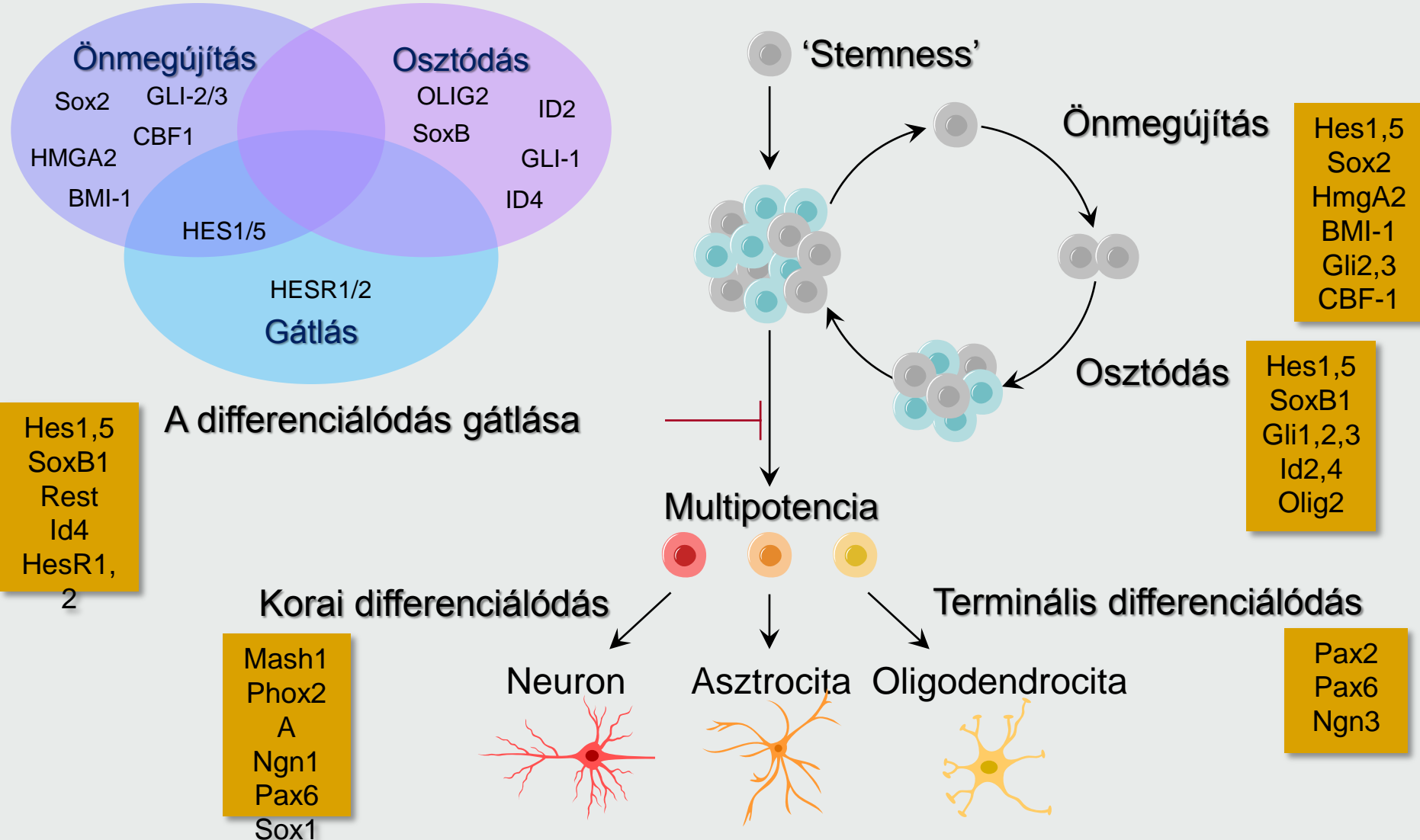
A hES sejtekből indított hNP differenciálódásban résztvevő faktorok

- A Pax6-ról kimutatták, hogy szükséges és elégséges faktor, arra, hogy az hES sejtek neuroepitél specializálódását indítsa be.
- A neurális rozetta minden sejtje képes lesz számos különböző sejtípust létrehozni, miután válaszképesek maradnak különböző megfelelő morfogénekre, pl. Wnt protein gátlók vagy Shh jelátvitel aktivátorok a dorzális telenkefalon előalakjait ventrális progenitorokká alakítja.
- Bár ez a képesség bizonyos növekedési faktorok (FGF-2 és EGF) jelenlétében elveszik.
- A hNP fenotípus fenntartása biztosított a Shh és Notch jelátviteli utak aktivációjával.
- Az *N*-[(3,5-difluorofenil)acetyl]-L-alanyl-2-fenil]glicin-1,1-dimetil-észter (DAPT) kezelés, mely a γ -szekretáz specifikus gátlója, a Notch jelátvitel gátlásához vezet és sikeres éretlen neurális differenciációt indít be a rozettában. Másrésztől azonban ha Shh-t adunk a tenyésztő médiumhoz, az megakadályozza ezt a folyamatot a neurális rozettákban .

A neurális sejtek regionális specifikitása

- A neurális cső záródása során a neuroepitélium különböző neurális progenitor osztályokat hoz létre, melyek később az előagy, középagy, hátiagy és a gerinchúr képzésében vesznek részt.
- Az extrinsic jelátviteli molekulák és az intrinsic transzkripciós faktorok komplex hálózata határozza meg a neuronális fenotípusokat. A szignalizációs molekulák (FGF-2, Wnt, Noggin, és BMP) manipulálása során kifejllesztésre került egy olyan feeder-sejt mentes rendszer ahol az ES sejtekből neurális progenitorok jöttek létre.
- A mezenkefalikus dopaminerg (DA) neuronok, amelyek a Parkinson kórban szenvedő betegekben elhalnak, a középagy középső rétegében lévő embrionális progenitorokból származtathatóak. A DA neuronok (funkcionális tirozin hidroxiláz [TH] pozitív neuronok) létrejötte a ventrális középső réteg sejtek által termelt Shh és az FGF8 aktivitástól függ.
- A Pax6 pozitív neuroepitél sejtek korai FGF8 kezelése kritikus lépés a dopaminerg fejlődésben. A transforming growth factor- α (TGF- α), melyet a korai embrionális struktúrák termelnek, ahol a középagy dopaminerg neuronjai jönnek létre feltehetőleg igen fontos a DA neuronok *in vitro* és *in vivo* differenciálódásában is. hES sejtek 21 napos TGF- α kondicionált médiumában a sejtek 15%-a TH pozitív lett és dopamint termelt.

Transzkripciós faktorok és neurális őssejtek



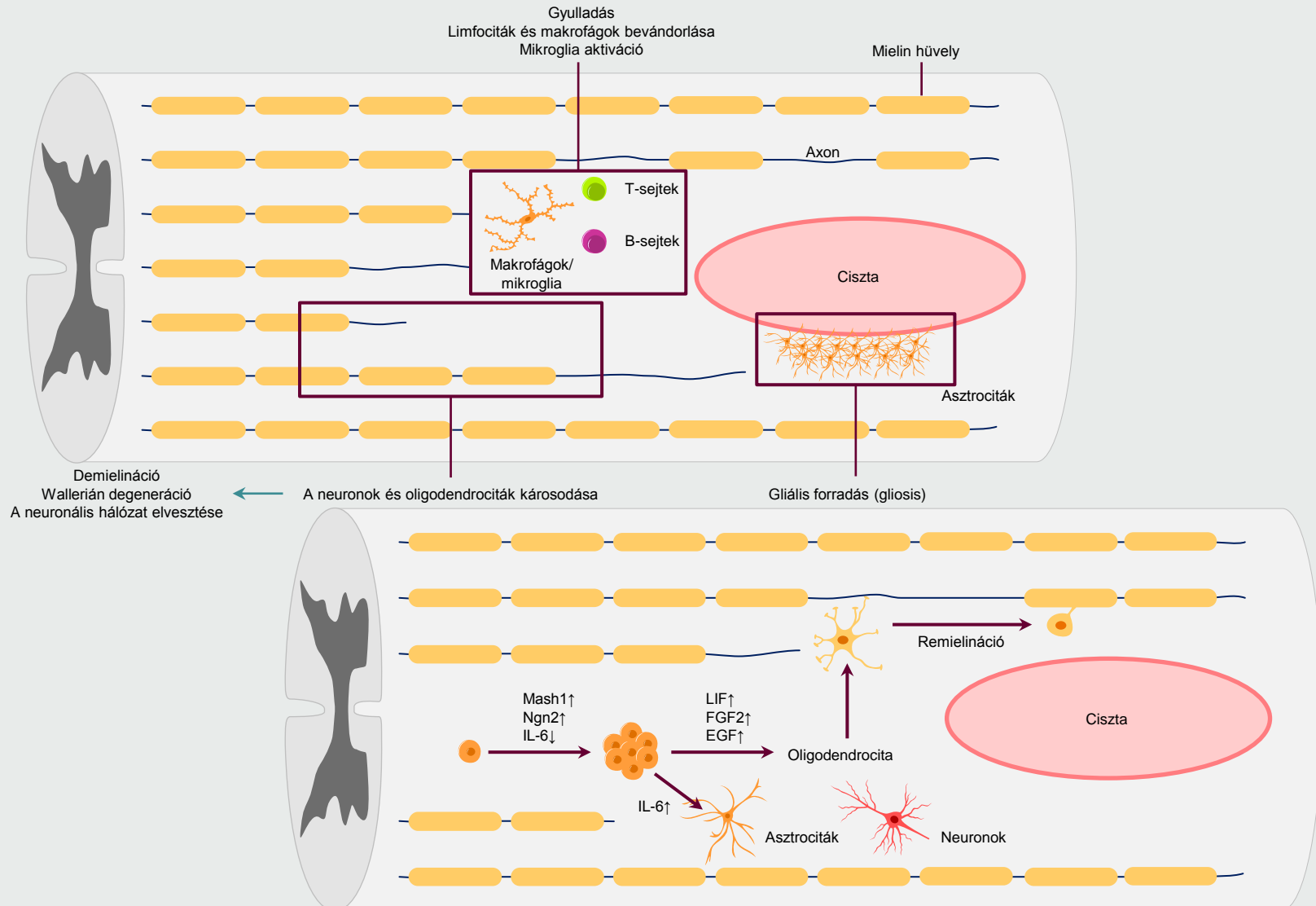
Az hES sejtekből történő motorneuron differenciálódás

- A motorneuronok (MN) számos körülmény hatására károsodhatnak pl. gerincvelői sérülés, amiotrofikus laterális szklerózis (ALS), és gerincvelői izom atrófia (SMA) során.
- A hES sejtek egy potenciális lehetőséget adnak motorneuronok létrehozására, melyek felhasználhatóak lehetnének a betegségek utáni regenerációs folyamatokban.
- Az idegcső ventrális oldalán négy különböző progenitor régió található: v3, MN, v2, és v1 progenitorok.
- Az MN progenitorok később érett MN-t képeznek, míg a többi progenitor sejtől különböző ventrális interneuron jön létre. Az Olig2, a bázikus „helix–loop–helix” transzkripciós faktor határozza meg a MN régiót.
- A MN sejtek utódsejtek választás elé kerülnek, hogy motorneuronokká vagy oligodendrocitákká alakulnak-e.
- Ez a folyamat a bLHH és a LIM homeobox transzkripciós faktorok (LHX3, LHX4), Hox gének (Nkx2.2, Phox, HB9) és a Pax6 faktorok egyedi kombinációjának a kontrollja alatt áll.

Gerincvelői sérülés

- A gerincvelői sérülés egy azonnali mechanikai trauma utáni igen komplex gyulladással, ischémiás kaskádöt jelent.
- A gerincvelői sérülés során károsodnak a felszálló és leszálló axonális idegpályák és sejtkárosodás, gyulladás, demielinizáció alakul ki.
- Ez mozgáskárosodást, a szenzoros és motoros kontroll kiesését is jelenti a lézió helyén és alatta
- A sérülés két fő patológiai állapotból áll:
 - az elsődleges sérülés során a mechanikai és szöveti károsodások jelentkeznek,
 - majd a másodlagos sérülés során egy biokémiai eseménysorozat részeként a gerincvelői szövet progresszív destrukciója zajlik le.

A gerincvelői sérülés (SCI) eseményei és az őssejtek közvetlen manipulációja SCI után



Őssejtkezelés SCI-ben

- Traumásan sérült gerinchúrbán a beültetett NP sejtek asztrocita irányban differenciálódnak feltehetően a gyulladásos környezet miatt. A TNF- α , IL-1 β és IFN- γ citokinek játszanak kitüntetett szerepet ebben az in vivo folyamatban.
- Az érett központi idegrendszerben a NP sejtek általában inkább az asztroglialis irányba és nem neurális vagy oligodendrocita irányba differenciálódnak. A neuronális/axoniális regenerációban a neuron és a mielin termelő oligodendrocita differenciálódás a cél.
- A BMP molekulák elősegítik az asztroglia differenciálódást, ellenben a BMP gátló Noggin pedig megakadályozza az asztroglia kialakulást. Az oligodendrocita és neuronális differenciációban helix loop helix faktorok, mint az emlős AS-C (MASH) homológ és a neurogenin faktorok vesznek részt. További érdekes adat az, hogy humán hematopoetikus őssejtek (HSC) csirke embrió gerincvelőjébe transzplantálva neuronokká differenciálódnak.
- Az embrionális őssejtek is felhasználhatóak a mielinizációs folyamatban, ha oligodendrocita irányban vannak differenciáltatva. Bizonyítékok állnak rendelkezésre arra nézve, hogy az emberi központi idegrendszerben jelen vannak olyan előalakok, amelyek oligodendrocita irányba elköteleződtek.

Nem őssejt-alapú megközelítések

- A szagló hüvelysejtek (OECs) egy olyan speciális gliasejt csoport, amely a szaglóneuronok axonjait öleli körül és mind a Schwann sejtek, mind pedig az asztociták tulajdonságait egyesítik, résztvesznek a regenerálódásban és a gerincvelői sérülést követő funkcionális felépülésben. A genetikailag módosított szaglóhüvely sejtek gliasejt-eredetű neurotrofikus faktort (GDNF) termelnek, egy retrovirális rendszer segítségével bejuttatva a sérült gerincvelőbe, *in vivo* GDNF-t produkálva elősegítette a sérült szövet regenerálódását.
- A másik gyakran használt transzplantátum gerincvelői sérülésekben a perifériás ideg. A bordaközi idegek együttes alkalmazása helyi FGF kezeléssel elősegítette az axonok regenerációját. A motoros gyógyulás egy másodlagos eredményként jelentkezett a túlélő neuronok toborzásával.
- Idegi növekedési faktort (NGF) termelő genetikailag módosított fibroblasztokat transzplantálva a striatum-ba, kolinerg axonok növekedését lehet elindítani a nucleus basalis-ból a graftok felé.

Retina regeneráció

- A retina egy komplex neurális hálózat, a fényt elektronikus impulzusokká alakítja és így tájékoztatja az agyat a körülvevő környezetről.
- Amiként az idegrendszer többi része, a retina is számos neurodegeneratív betegségnek lehet a tárgya, mely vizuális károsodást, súlyos esetben vakságot jelent. Számos retina degenerációs betegség csak bizonyos sejttípusokat érint a retinán belül
- Számos gerinces (az emlősöket nem beleértve, halak, kétéltűek, és frissen kikelt madarak) figyelemreméltó regenerációval rendelkezik a retina károsodása után
- Az emlősökben, különösen az emberben, igen kismértékű az elvesztett sejtek regenerációs képessége. Bár az alacsonyabb rendű gerincesek regenerációjából szerzett ismeretek segíthetnek megérteni esetleges lehetőségeket az ember esetén.

Müller glia általi retina regeneráció

I.

- A Müller glia egy potenciális alanya lehet a retinális előalakoknak a melegvérű gerincesekben. A Müller glia a retina legfőbb támasztósejt típusa és minden gerinces osztályban megtalálható és ez az egyetlen retinális glia sejt, ami az embrionális retina neuroepitél őssejtjeiből ered. A többi retinális glia sejt extraretinális eredetű lehet (mikroglia, asztrocita, oligodendrocita és nem-asztrocitális belső-retina gliasejtek).
- A Müller glia sejt feladatai közé tartozik, hogy szerkezeti támasztékot nyújtson, részt vegyen a szinaptikus támogatásban ill. a retinális neuronok ozmotikus és metabolikus viszonyait is támogassa. Számos gerinces osztályban a Müller glia sejtek képesek dedifferenciálódni, osztódni és progenitor-szerű állapotba jutni, ha akut retina sérülés történik, vagy éppen külső növekedési faktorokra adnak így választ.

Müller glia általi retina regeneráció

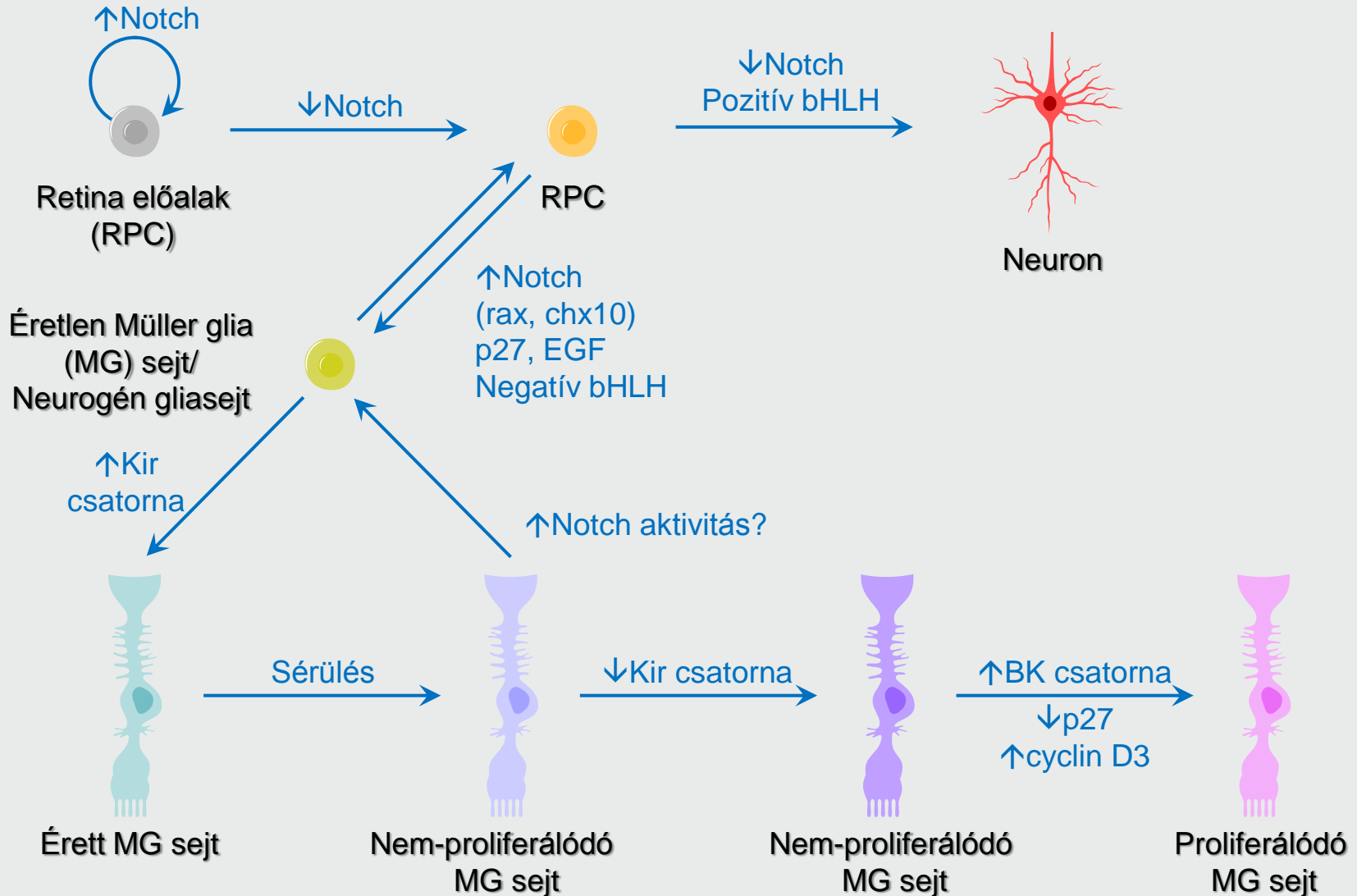
II.

- A regenerálódás során a Müller glia dedifferenciálódik, osztódik és neurális előalakokká válik a károsodott retinákban.
- A Müller glia dedifferenciálódása során újra belép a sejtciklusba és specifikus embrionális retina progenitor transzkripciós faktorokat (ascl1a, Pax6, notch Chx10, Six3, Sox2, and Sox9) expresszál.
- Néhány neuron képes önálló regenerálódásra, bár az osztódó Müller glia több ezer differenciálatlan előalakot hoz létre, amelyek képesek regenerálni a retinát és így a látást helyreállítani.

Retina őssejtek/progenitor sejtek (RPC)

- A retina anterior szélén, a ciliáris marginális zónában (CMZ) vagy circumferenciális germinális zónában (CGZ) melyet „ora serrata”-nak is neveznek, található a retinához köthető őssejt-zóna különösen a halakban, kétéltűekben és madarakban.
- Sérüléskor ez a régió új retinális neuronokat hoz létre, habár ezek a sejtek nem vesznek részt a retina nagyobb részének a regenerációjában.
- Emlősökben (emberben) a régió azonosítása vitatott, feltehetőleg elveszett.
- Ez a jelenség arra a tényre utal, hogy a CMZ régió progresszív elvesztése történik meg a gerincesek evolúciója során.

Retina előalakok és plaszticitásuk



Nem-szem eredetű előalakok

- Egér és emberi ES sejteket retinális sejtekké (fotoreceptorok, retinális pigment epitélium) lehet differenciáltatni a FGF, taurin, RS, Shh faktorok lépcsőzetes adásával.
- A csontvelői őssejteket (BMSC) is retina markereket expresszáló sejtekké lehet alakítani. Érett BMS sejtek *in vitro* aktivin A, taurin, EGF kezelése indukálja azt, hogy olyan sejtekké módosulnak melyek rhodopsin, opsin, recoverin molekulákat expresszálnak. Továbbá, a sejtek transzplantációja a szubretinális üregbe azt eredményezi, hogy ezek a sejtek képesek lesznek a retinába integrálódni és fotoreceptor rétegekhez hasonló struktúrákat létrehozni.
- Az érett neurális progenitor sejtek képesek alkalmazkodni különböző körülményekhez és a retinasejtek számos, bár nem az összes tulajdonságát expresszálni egy permisszív környezetben.

Őssejtek a cornea-ban

- A szaruhártya áttetszősége és a vizuális pontosság függ a külső védő epitélium réteg integritásától és funkcióképességétől.
- A szaruhártya epitel őssejtjei a cornea és a szomszédos kötőhártya epitélium találkozásánál az un. limbális régióban találhatóak.
- Ezek a limbális epitel őssejtek (LESC) felelősek a cornea epitélium fenntartásáért egész életen át.
- A LESC-r jellemző, hogy pozitívak a $\Delta Np63\alpha$ ABCG2, Notch-1, N-cadherin markerekre és negatívak a citokeratin 3, 12 és connexin 43 gap junction fehérjékre.
- A szemfelszín hibái eredhetnek az LESC sejtek deficienciájából (elsődleges, örökölt szembetegség), de sokkal gyakoribb az, hogy egyéb külső körülmények, szerzett faktorok (kémiai ágens általi sérülés, limbális műtét) járulnak ehhez.

Cornea regenerálódás

- 1997-ben először egy sikeres őssejt terápiát hajtottak végre az LESC deficienciát gyógyítandó 2 kémiai égési sérült betegen. Az eljárás során limbális biopsziából autológ LESC sejteket izoláltak és *ex vivo* felnevesztés után juttatták vissza a sejteket.
- A klinikai eredmények biztatóak voltak, mivel mindkét betegnél látásjavulást tapasztaltak legalább két évig a követés során.
- Azóta számos centrum felhasználta ezt az eljárást és az átlag eredmények mind autológ és allogén LESC kezelés esetén mintegy 70% sikeres terápiáról számolnak be.
- Jelenleg alternatív módszerek kidolgozását végzik, LESC sejtek helyett ES sejteket, száji mukozális epitél sejteket (OMEC) vagy bukkális keratinocitákat használnak fel

Érzékszőr sejtek regenerálódása

- A hallásvesztés egy globális probléma, igen nagy populációt érint világszerte.
- A belső fül cochlea szőrsejtjeinek a regenerációja lehet a legjobb kezelés a halláskárosodásra. Ugyanakkor a szőrsejt regeneráció mellett a teljes cochleáris regenerációt is számításba kell venni a komplex halláskárosodási tünetek során.
- A nem-emplős gerincesek szőrsejt regenerációjában a támasztósejtek ismét belépnek a sejtciklusba ha a szomszédos szőrsejt elhal. A mitotikus támasztósejtek aszimmetrikusan osztódva új szőrsejteket és támasztósejteket hoznak létre.
- A hallókészülékek és cochleáris transzplantátumok mellett terápiás megoldásként lehet számolni az őssejtekkel, gének és kis molekulák bevitelével, melyek befolyásolják az Atoh1 (Math1) expressziót és Notch jelátviteli utat.

Összefoglalás

- ES sejtekből neuronális progenitor sejteket lehet differenciáltatni.
- A differenciáltatott sejteket fel lehet használni lehetséges terápiákban pl. SCI kezelésben.
- Nem-össejt alapú megközelítések és humorális faktorok segítségével alternatív megoldások is lehetségesek.
- A retina regenerálódásban a Müller glia sejtek transzdifferenciálódhatnak. Bár retina őssejtek jelen vannak alacsonyabb gerincesekben, az emlősökre vonatkozó adatok nem ígéretesek.
- A cornea regenerálódás során a limbális epiteliális őssejteket lehet felhasználni.
- Halláskárosodásban lehetővé válhat a szőrsejtek regenerációja, előalakok transzplantációjával, virális génbevitel segítségével kontrollálva az Atoh1 és sejtciklus géneket.