

Őssejtek, őssejtterápia - alapfogalmak és alapjelenségek

- alapfogalmak
- transzdifferentiáció
- mezenchimális sejtek (MAPCs)
- sejtfúzió
- az "igazi klónozás" (SCNT)
- az igazi áttörés ? (iPS) - reprogramming
- a klinikai alkalmazás lehetőségei, korlátai
- őssejtek és a gyógyszerkutatás
- etikai megfontolások

klónozás: azonos genetikai állományú egyed létrehozása szöveti sejtből

transzdifferenciáció: végdifferenciált felnőtt sejt fenotípus-váltása

transztermináció: alternatív fejlődési útvonal választása

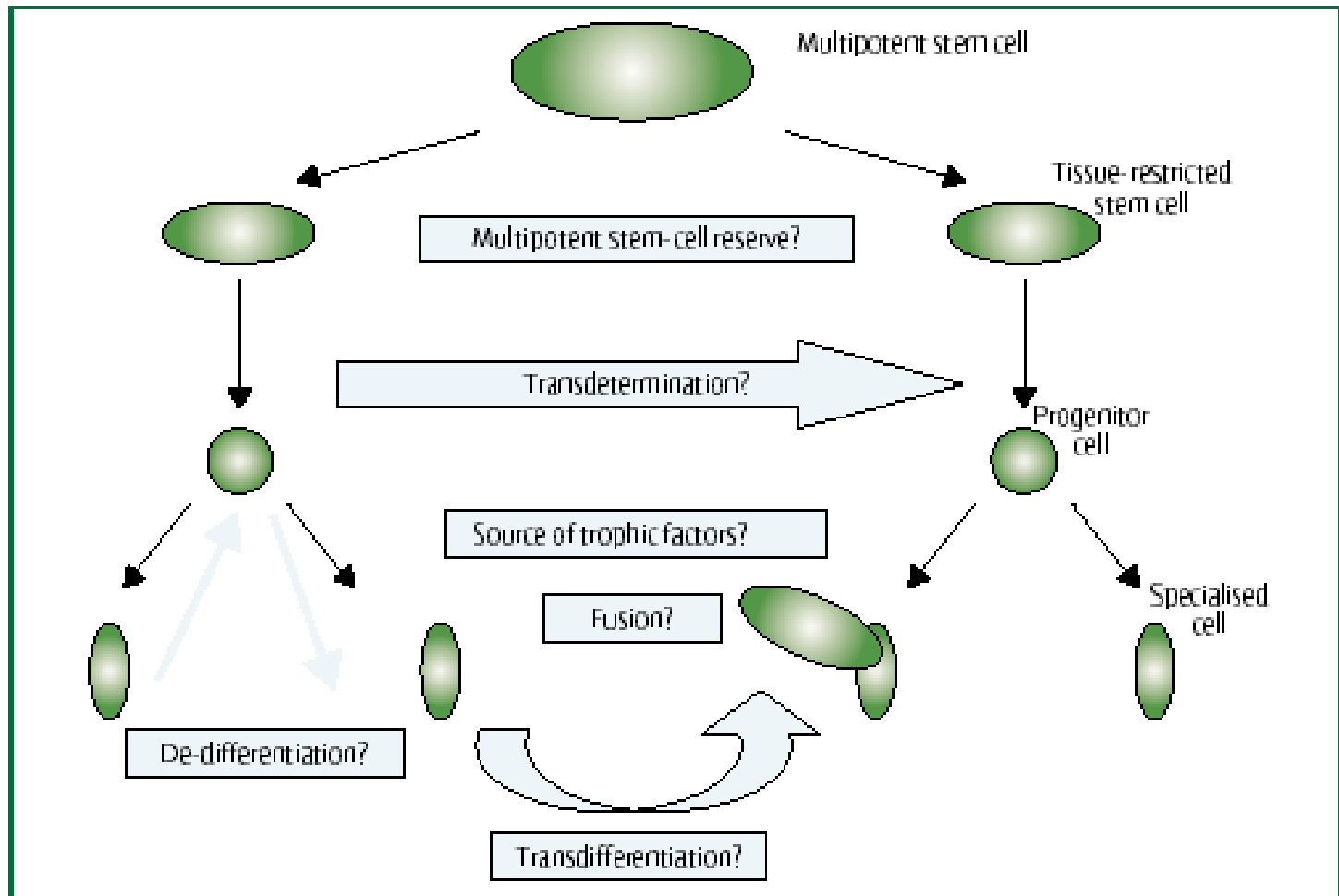
dedifferenciáció / reprogramming: korábbi, kevésbé elkötelezett fejlődési potenciál visszanyerése

sejtfúzió: 2 szomatikus sejt egyesítése ($4n!$)

regenerative medicine / regeneratív orvoslás: károsodott szerv / szövettípus pótlása, „újranövesztése”

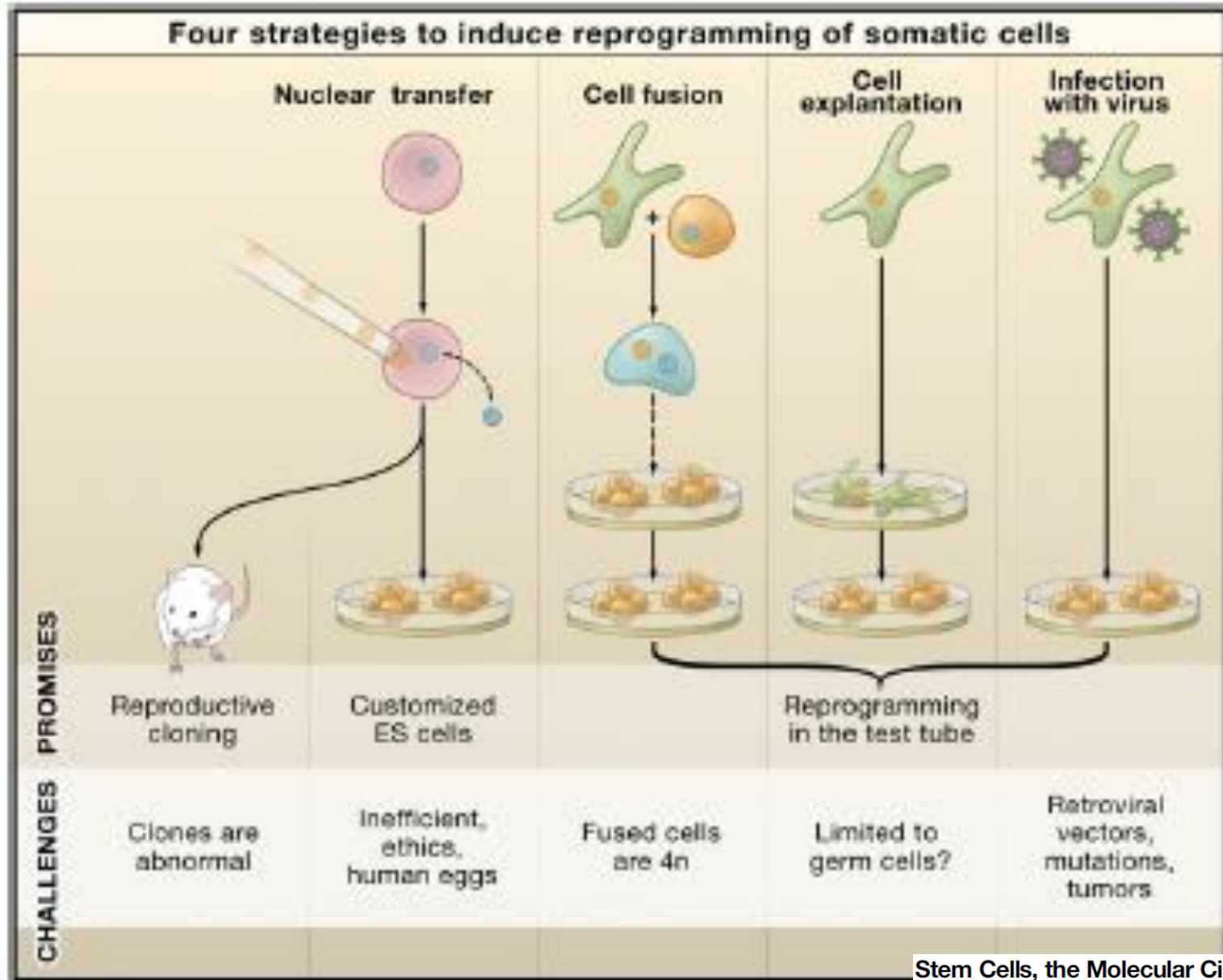
plaszticitás: külső környezeti hatásokra a sejtsors (cell fate) megváltoztatása

Az őssejtek plaszticitása: mindenből lehet minden?



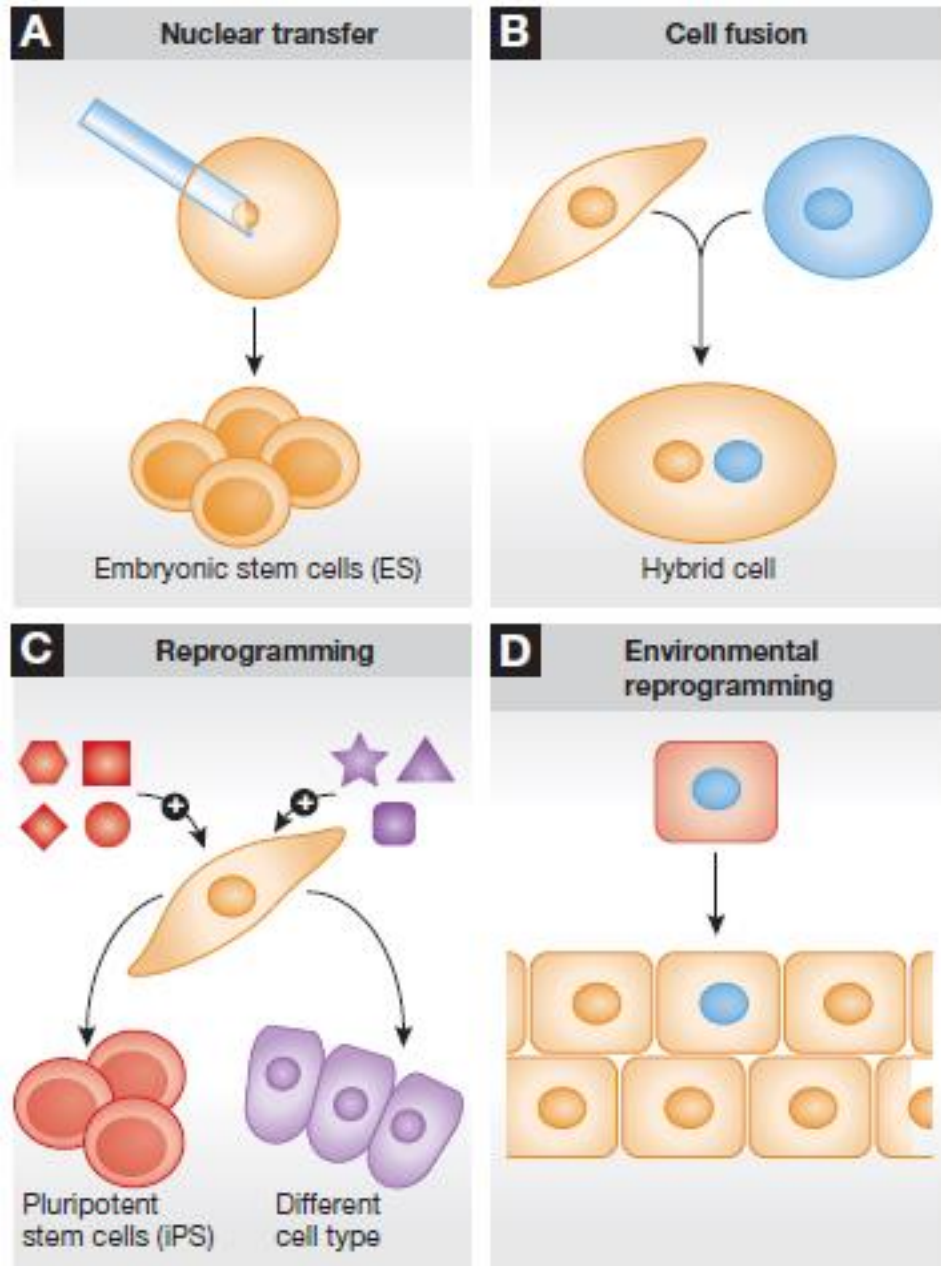
C M Rice, N J Scolding; Lancet, 364:193-199. 2004

Testi sejtek „újraprogramozása”



Stem Cells, the Molecular Circuitry of Pluripotency and Nuclear Reprogramming

Testi sejtek „újraprogramozása”



- A.** Nuclear transfer into an enucleated oocyte reprograms a somatic nucleus, thus generating a blastocyst from which ES cells can be derived.
- B.** Cell fusion exposes two different nuclei to the same cytoplasm, and one nucleus may impose its transcriptional program (red) over the other (blue).
- C.** Transfer of specific transcription factors may reprogram a somatic cell (yellow) to a pluripotent (iPS) or to another differentiated cell type (red).
- D.** Transplantation of a genetically labeled (blue nucleus) differentiated cell (red) to a different tissue (yellow) may activate that developmental program in the transplanted cell.

‘Hearts and bones’: the ups and downs of ‘plasticity’ in stem cell biology

Paola Bonfanti¹, Yann Barrandon², Giulio Cossu^{3,4,5*}

EMBO Mol Med 4, 353–361

1. **transzdifferentiáció**: végdifferentiált felnőtt sejt fenotípus-váltása

- nyelőcső: simaizomból vázizom (Patapoutian Science 1995 270:1818-1821) - DE Rishniw Genesis 36:81-82, 2003
- csontvelő -> izom (Ferrari Science 279:1528-1530 1998)
- neuron -> vér (Björnson Science 283: 534-537 1999)
- vér -> neuron (Mezey 2000 Science 290:1779-1782)
- vér -> hepatocita (Lagasse 2000 Nat Med 6:1229-1234)

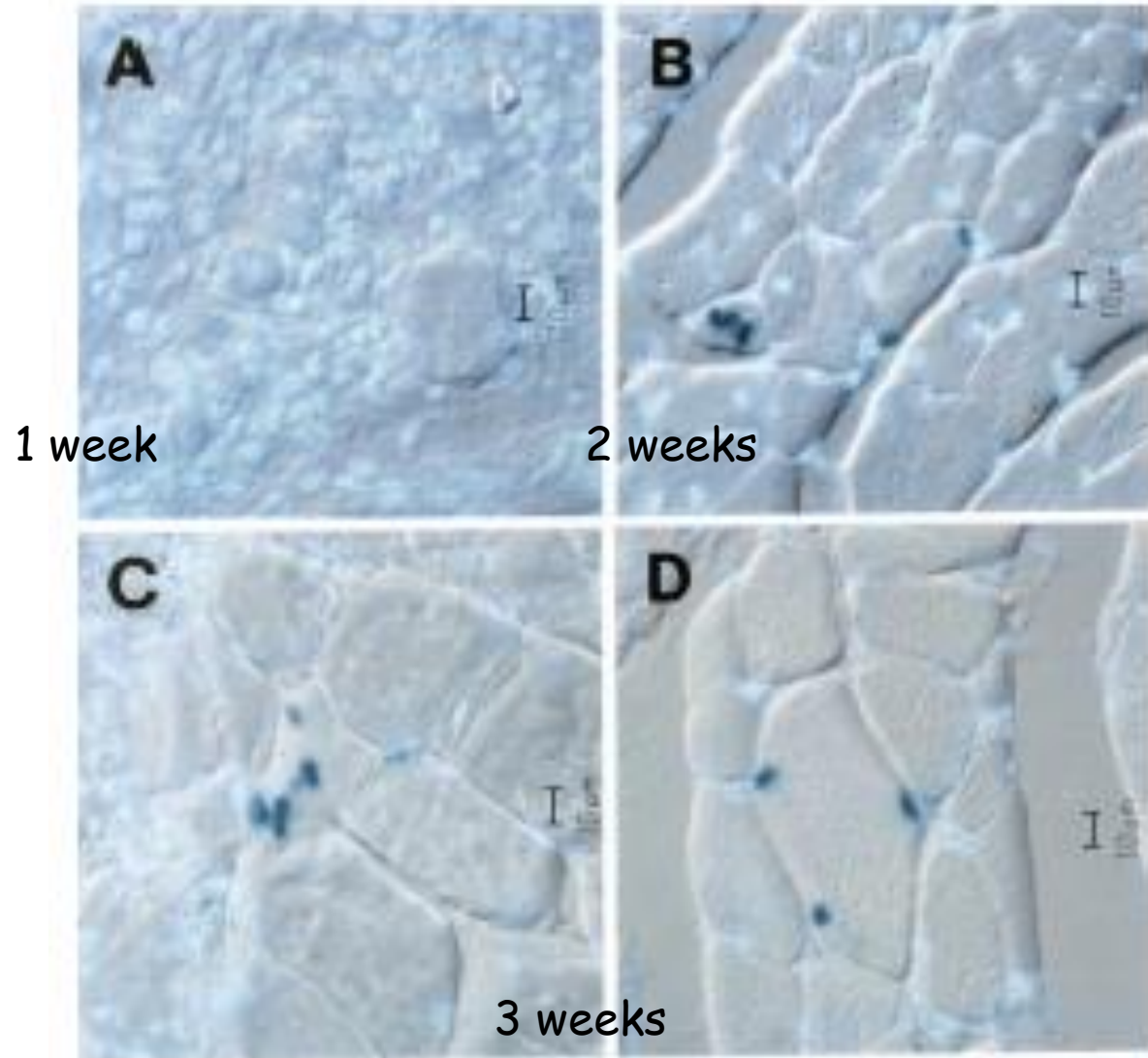
[manapság „**environmental reprogramming**”-nak, azaz környezeti újraprogramozásnak nevezik....]

Muscle Regeneration by Bone Marrow-Derived Myogenic Progenitors

SCIENCE • VOL. 279 • 6 MARCH 1998

Giuliana Ferrari, Gabriella Cusella-De Angelis, Marcello Coletta, Egle Paolucci, Anna Stornaiuolo, Giulio Cossu,* Fulvio Mavilio*

scid egér roncsolt izmába MLC-LacZ egérből izolált csontvelői sejtek beültetése

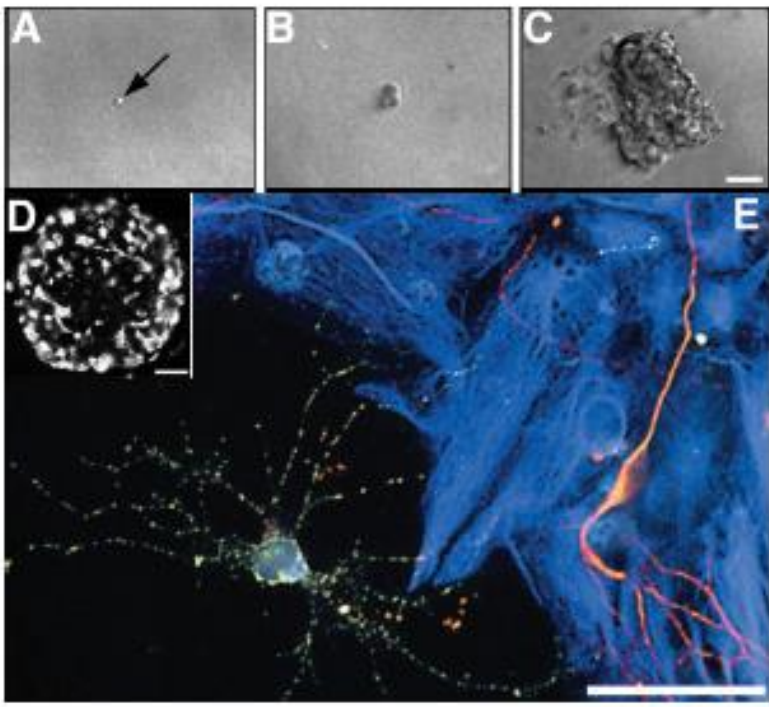


Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo

Christopher R. R. Bjornson,*†‡ Rodney L. Rietze,*§
 Brent A. Reynolds, M. Cristina Magli, Angelo L. Vescovi†

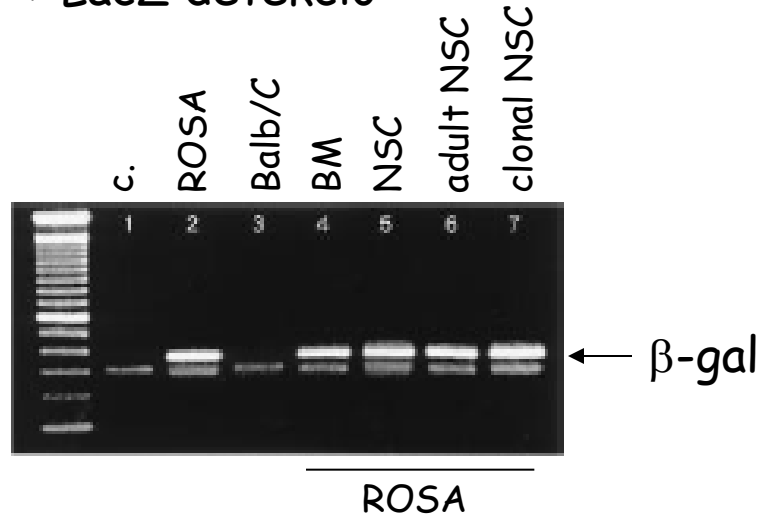
22 JANUARY 1999 VOL 283 SCIENCE

1. NSC (neural stem cell) izolálás
 LacZ+ ROSA egerekből

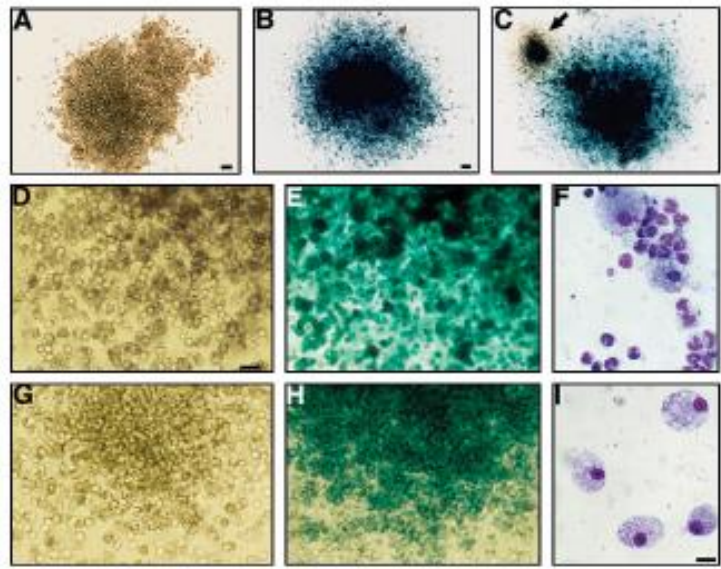


in vitro differenciáció: neuron,
 asztroglia, oligodendroglia

2. szubletálisan besugárzott Balb/c egerekbe ROSA NSC visszaültetés -> LacZ detekció



-> in vitro klón-formáció (de endogén hematopoietikus SCs is detektálható)



Turning Brain into Blood: A Hematopoietic Fate Adopted by Adult Neural Stem Cells in Vivo

Christopher R. R. Bjornson,*†‡ Rodney L. Rietze,*§
 Brent A. Reynolds, M. Cristina Magli, Angelo L. Vescovi†

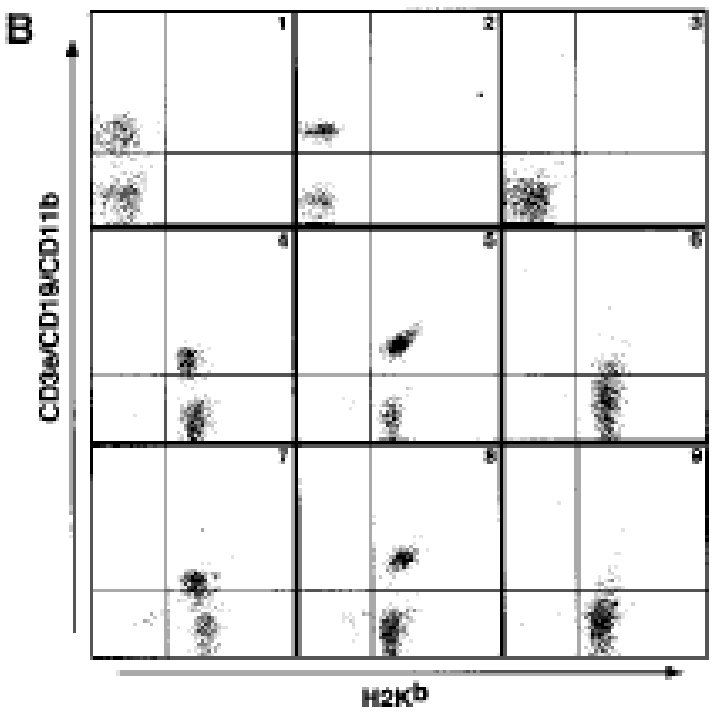
22 JANUARY 1999 VOL 283 SCIENCE

3. FACS: ROSA-specific (H-2K^b) vs T / B limfocita / myeloid markerek azonosítása

A

	Balb/c	ROSA 26	EBSS	Bone Marrow	Adult NSCs	Embryonic NSCs
% H-2K^b						
Peripheral Blood	2.35±0.40	94.2±1.13	1.68±0.43	58.7±12.6	43.1±6.87	43.9±6.98
Spleen	0.92±0.15	97.3±1.03	1.68±0.44	95.3±2.45	65.4±23.5	60.7±11.0
Bone Marrow	2.26±0.55	42.3±1.09	1.59±0.51	38.6±2.48	35.8±10.0	40.4±6.81
CD3 ⁺ /H-2K ^b	0.52±0.08	33.0±5.16	0.77±0.05	31.9±2.62	28.1±14.2	9.86±4.69
CD11b ⁺ /H-2K ^b	0.47±0.09	30.0±2.24	0.43±0.02	14.5±3.85	14.9±10.9	19.5±6.88
CD19 ⁺ /H-2K ^b	0.57±0.08	51.0±1.90	0.59±0.07	58.2±2.50	26.8±11.7	31.8±1.38

T cell
 B cell
 myeloid



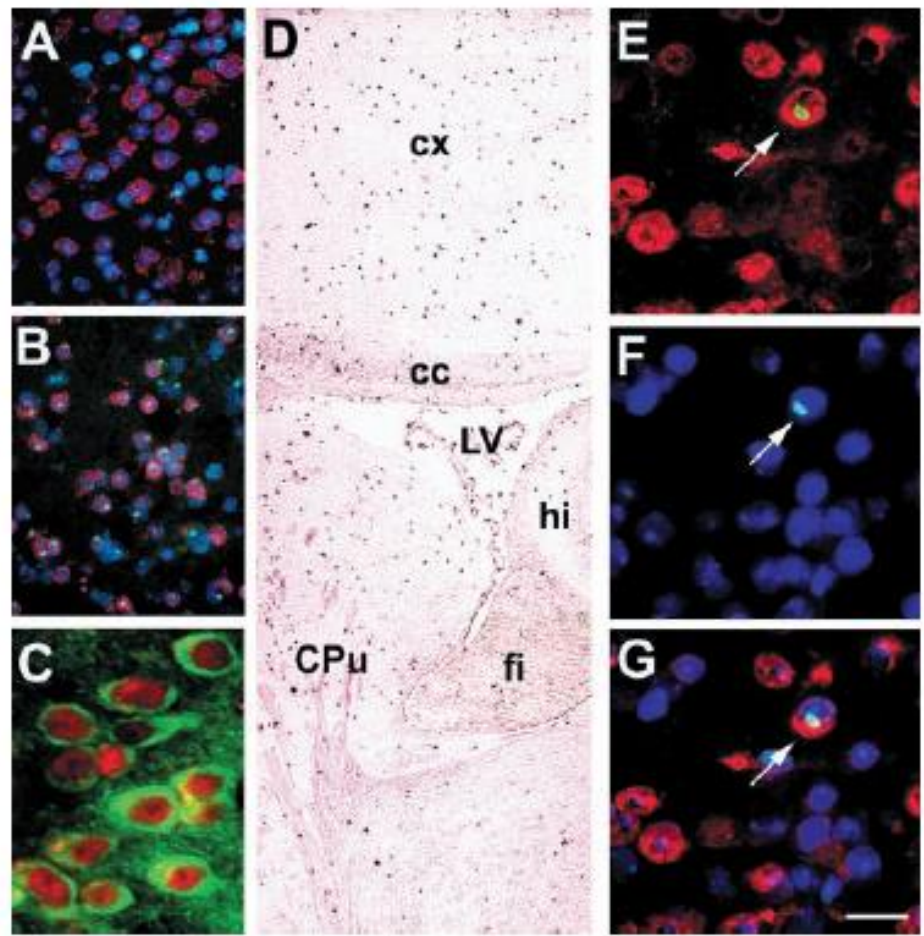
Turning Blood into Brain: Cells Bearing Neuronal Antigens Generated in Vivo from Bone Marrow

Éva Mezey,^{1*} Karen J. Chandross,² Gyöngyi Harta,¹
Richard A. Maki,^{3,4} Scott R. McKercher³

SCIENCE VOL 290 1 DECEMBER 2000

PU.1^{-/-} egér: hematopoetikus lineage hiány, makrofág, neutrofil, hízósejt, oszteoklaszt, T és B limfocita nélkül születik -> donor csontvelő kell; nőstény egerekbe hím csontvelő -> Y kr. lokalizáció az agyban

0.3 - 2.3% Ykr / NeuN sejtek



Age (months)	DAPI-positive nuclei counted	NEU-positive nuclei counted	Y chromosome-positive cells	Y chromosome/NEU (double-labeled)	Neu-positive nuclei in all cells (%)	Y chromosomes in all cells (%)	Y of Neu-positive cells (%)
4	4831	1908	120	6	39	2.5	0.3
4	1322	221	60	5	17	4.5	2.3
3	3675	1483	130	16	40	3.5	1.1
3	4550	1825	105	15	40	2.3	0.8
2	3731	1039	162	16	28	4.3	1.5
1	1913	464	86	8	24	4.5	1.7
1	1660	380	76	7	23	4.6	1.8

transzdifferentiáció: végdifferentiált felnőtt sejt fenotípus-váltása

problémák:

- sejtfúzió (de pl. vázizomnál ez természetes)
- endogén őssejtek aktiválása
- nem lineage-specifikus donor őssejtek izolálása
- in vitro differentiáció azonosítása marker fehérjék megjelenésével, ill. idegen marker specificitása - funkcionális megjelenés kell!
- in vitro artefakt / transzformáló hatás
- őssejt-populáció inhomogenitása
- "igazi" pluripotencia teszt (pl. in vivo teratóma kialakítás) számos esetben hiányzik
- elég ritka / nem követhető folyamat
- nagyfokú átalakulást, repopulációt igényel
- főleg alacsonyabb rendű gerincesekben
- napjainkban már tabu kifejezés..... de az environmental reprogramming kezd újra divatba jönni - és a transdifferentiation is!!

Enviromental / direct reprogramming

'Hearts and bones': the ups and downs of 'plasticity' in stem cell biology

Paola Bonfanti¹, Yann Barrandon², Giulio Cossu^{3,4,5*}

EMBO Mol Med 4, 353–361

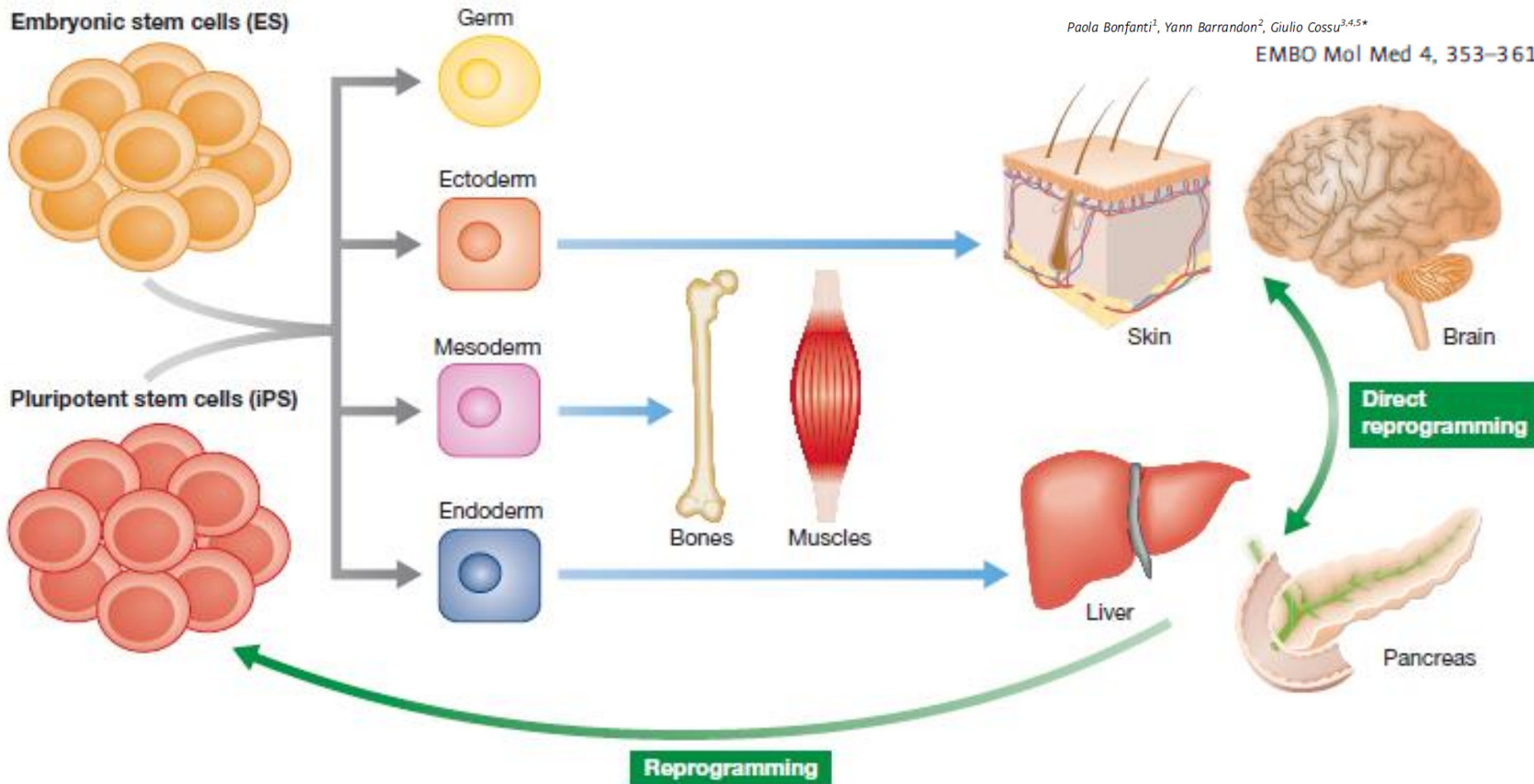
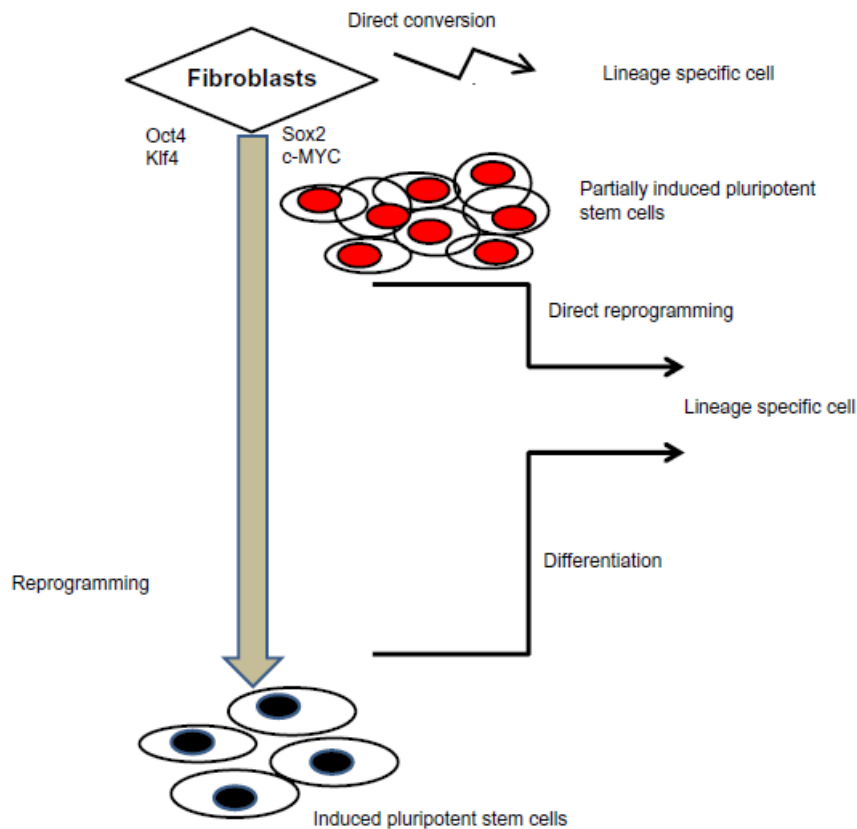


Figure 2. Changing the model of cell determination and differentiation. Grey arrows indicate the ability of ES and iPS cells to give rise to germ and somatic layers, that proceed (light blue arrows) towards their various differentiated tissues. Green arrows represent the possibility of reprogramming differentiated cells to a pluripotent state or directly to a different differentiated cell type, independently from the germ layer of origin.

transzdifferentiáció és direct reprogramming



Direct reprogramming of adult cells: avoiding the pluripotent state

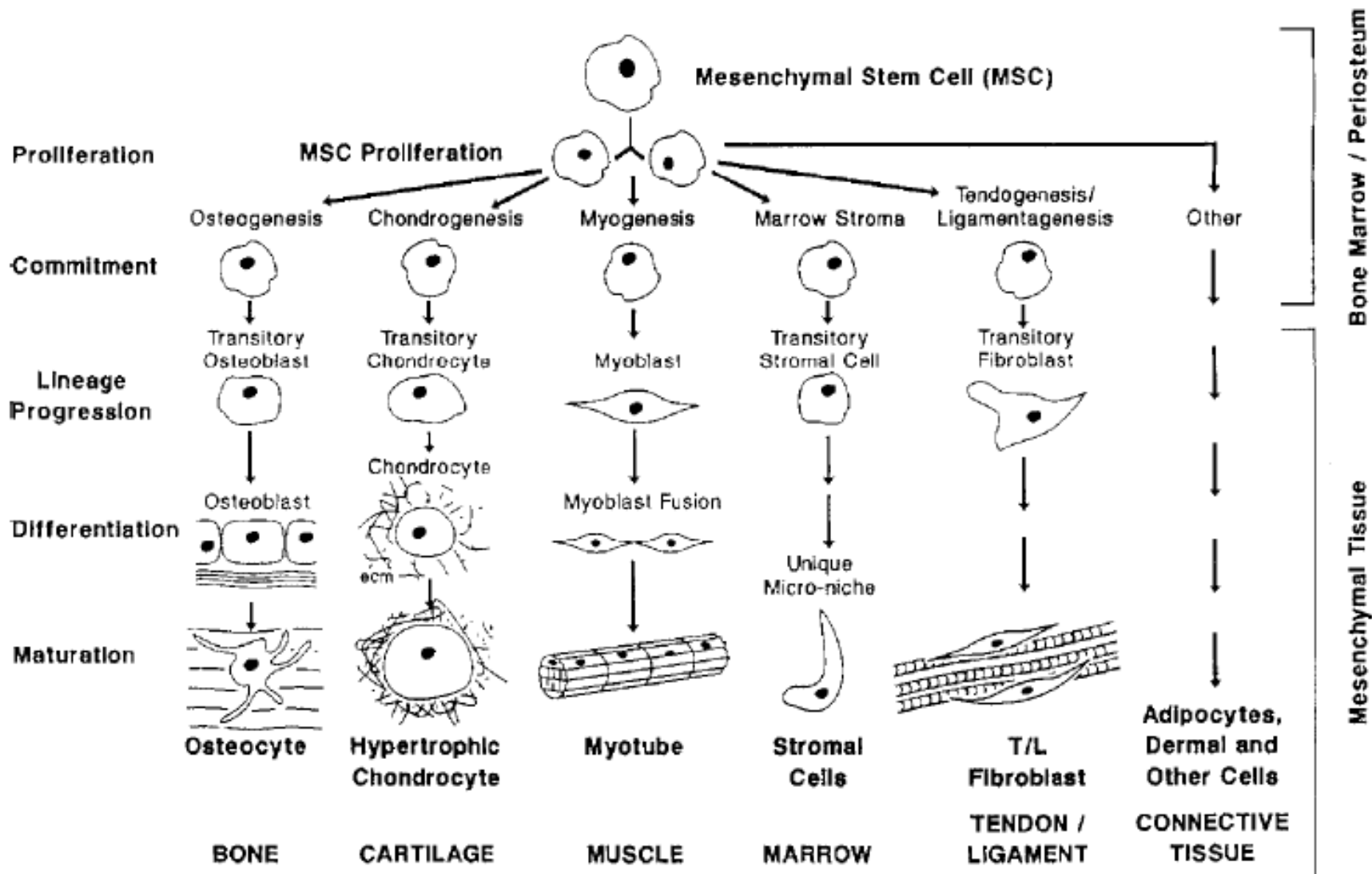
Abbreviations: Ascl1, achaete-scute homolog 1; Brn2, (brain-2) also called Pou3 or POU class 3 homeobox 2; c-MYC, c-mycelocytomatosis oncogene; ERG1, epilepsy-related gene 1; ETV2, ETS translocation variant 2; FLI1, Fli-1 proto-oncogene; ETS, transcription factor (previous name: Friend leukemia virus integration 1); GHMT, Hand2 + GMT; Hand2, heart- and neural crest derivatives-expressed protein 2; iPS, induced pluripotent stem; Klf4, Kruppel-like factor 4; MafA, v-maf avian musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog A; Mef2c, myocyte-specific enhancer factor 2C; MEFs, mouse embryonic fibroblasts; miR-1, microRNA-1; miR-133, microRNA-133; MyoD, myogenic differentiation; Myt11, myelin transcription factor 1-like; Ngn3, neurogenin 3; Oct4, octamer-binding protein; Pdx1, pancreatic and duodenal homeobox 1; Sox2, sex determining region Y-box containing gene 2; Tbx5, T-box transcription factor; VEGF, vascular endothelial growth factor.

Table 1 Examples of different types of cellular reprogramming and their corresponding reprogramming factors used for directing cell fate switch

Cell origin	Derived cell type	References
Examples of reprogramming		
Fibroblasts	iPS cells	
Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC		Takahashi ¹³
Oct4, Sox2 + valproic acid		Huangfu, ⁸⁰
Oct4, Sox2, c-MYC + kenpaullone		Lyssiotis ⁸³
Oct4, Klf4 + CHIR99021 (MEFs)		Lj ⁸²
Examples of transdifferentiation and direct reprogramming		
Fibroblasts	Muscle	
MyoD		Davis ³⁴
Pancreatic (exocrine)	Pancreatic (beta cells)	
Ngn3, Pdx1, MafA		Zhou ⁴⁴
Fibroblasts	Neurons	
Ascl1, Brn2, Myt11		Vierbuchen ²⁶
Fibroblasts	Cardiomyocytes	
Gata4, Mef2c, Tbx5		Ieda ²⁷
Gata4, Mef2c, Tbx5, Hand2		Song ⁴⁵
Gata4, Mef2c, Tbx5, VEGF		Mathison ⁴⁹
Mef2c, Myocardin, and Tbx5		Protze ⁴⁶
Fibroblasts	Cardiomyocytes	
Myocardin, miR-1, miR-133, GHMT		Nam ²⁹
Fibroblasts	Endothelial cells	
Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC (4-day partial reprogramming)		Margariti ⁵⁵
Oct4, Sox2, Klf4, c-MYC (Short reprogramming)		Lj ⁶²
Amniotic	Endothelial cells	
ETV2, FLI1, ERG1		Ginsberg ⁶⁴

mezenchimális (csontvelői) őssejtek vagy MAPCs (multipotent adult progenitor cells)

THE MESENGENIC PROCESS



Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow

NATURE | VOL 418 | 4 JULY 2002 |

Yuehua Jiang[†], Balkrishna N. Jahagirdar^{†‡}, R. Lee Reinhardt[§], Robert E. Schwartz^{*}, C. Dirk Keene^{||}, Xilma R. Ortiz-Gonzalez^{||}, Morayma Reyes^{*}, Todd Lenvik^{*}, Troy Lund^{*}, Mark Blackstad^{*}, Jingbo Du^{*}, Sara Aldrich^{*}, Aaron Lisberg^{*}, Walter C. Low^{||}, David A. Largaespada[¶] & Catherine M. Verfaillie^{†‡}

mezenchimális sejtek pluripotensek?

- > mezenchima
- > viscerális endoderma
- > neuroektoderma
- > endoderma

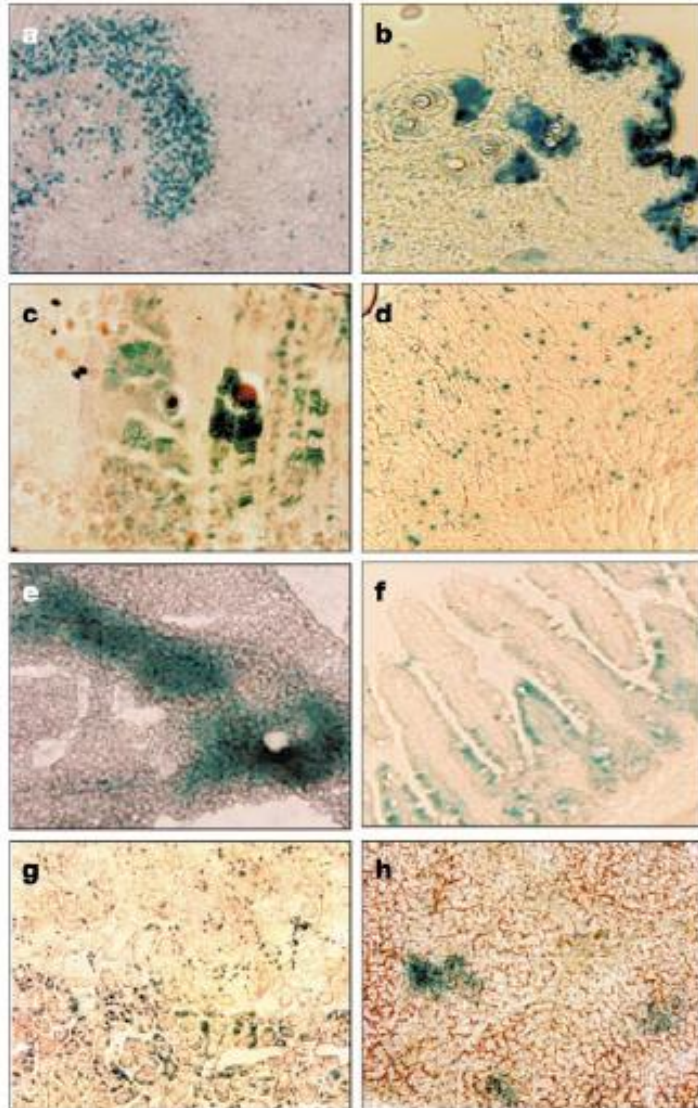


Figure 4 Chimaerism detection by X-gal staining and anti- β -gal staining in animals generated from blastocysts microinjected with a single ROSA26 MAPC (see also Table 1 and Supplementary Information Fig. 4). **a–h**, Images from X-gal-stained individual organs from a 45% chimeric mouse, determined by Q-PCR for Neo on tail clip. Tissue sections were from: brain (**a**), skin (**b**), skeletal muscle (**c**), myocardium (**d**), liver (**e**), small intestine (**f**), kidney (**g**) and spleen (**h**). **i, j**, Images from an X-gal-stained section through a mouse that was not chimeric (**i**) or was 45% chimeric (**j**). Magnification, $\times 20$.

mezenchimális (csontvelői) őssejtek vagy MAPCs (multipotent adult progenitor cells)

Mesenchymal Stem Cell-Based Therapy

Vaibhav Mundra,[†] Ivan C. Gerling,[‡] and Ram I. Mahato^{*,†}

- valószínűleg fő jelentőségük a trofikus hatás: számos GF termelése -> endogén, szövetspecifikus progenitorok "reaktiválása"

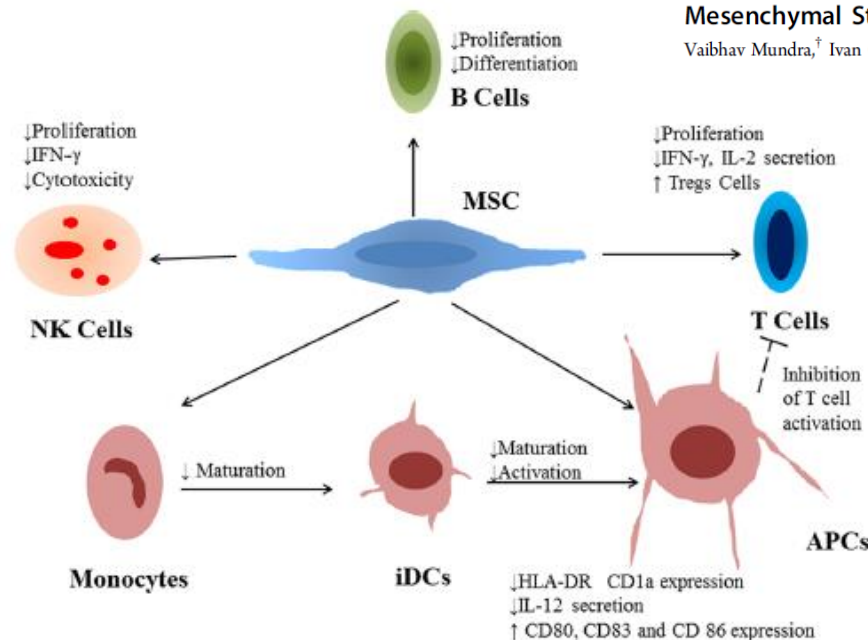
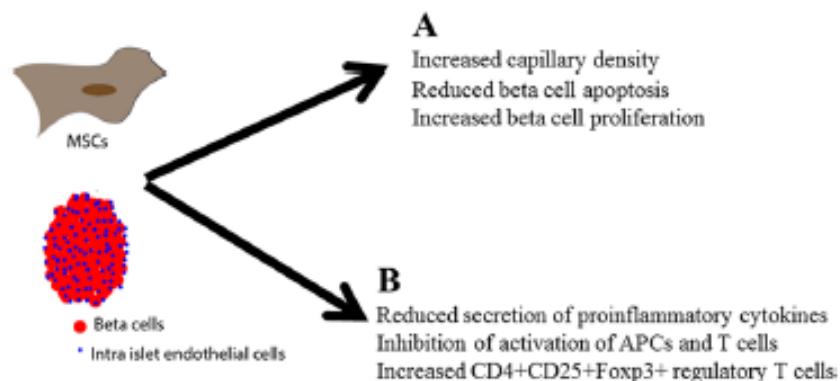


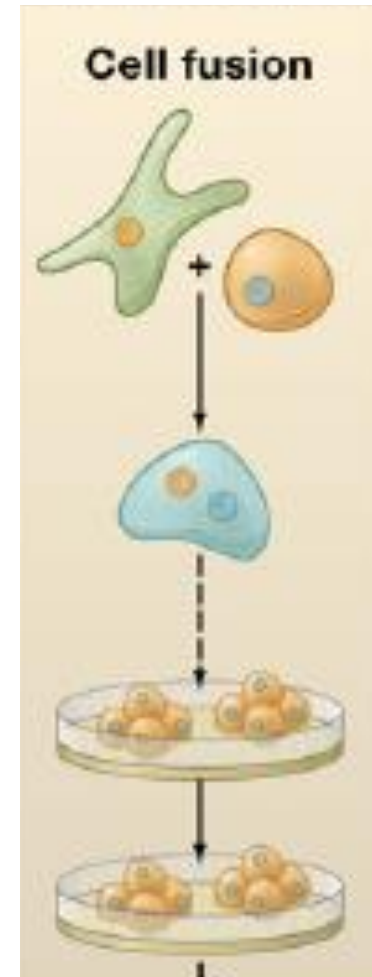
Figure 1. Immunomodulatory effect of MSCs. MSCs affect proliferation, maturation, and cytokine secretion by different immune cells. NK cells, natural killer cells; iDCs, immature dendritic cells; APCs, antigen presenting cells.

- immunológiai elimináció csökkentése, regeneratív mikrokörnyezet fenntartása
- type 1 diabétesz kezelése: izolált béta sejtekkel / szigetekkel kotranszplantáció



sejtfúzió

- heterokarion, poliploidia; regeneratív szövetekben gyakran előfordul (főleg máj, de simaizom, cerebellum, szív, méh, pajzsmirigy)
- csontvelő átültetés után donor sejtek
mikroglia/makroglia
agy
Purkinje sejt
máj
szív (donor sejtek főleg ott vannak,
ahol normálisan sok a fúzionáló sejt)
- betegség esetén a poliploidia előny lenne?

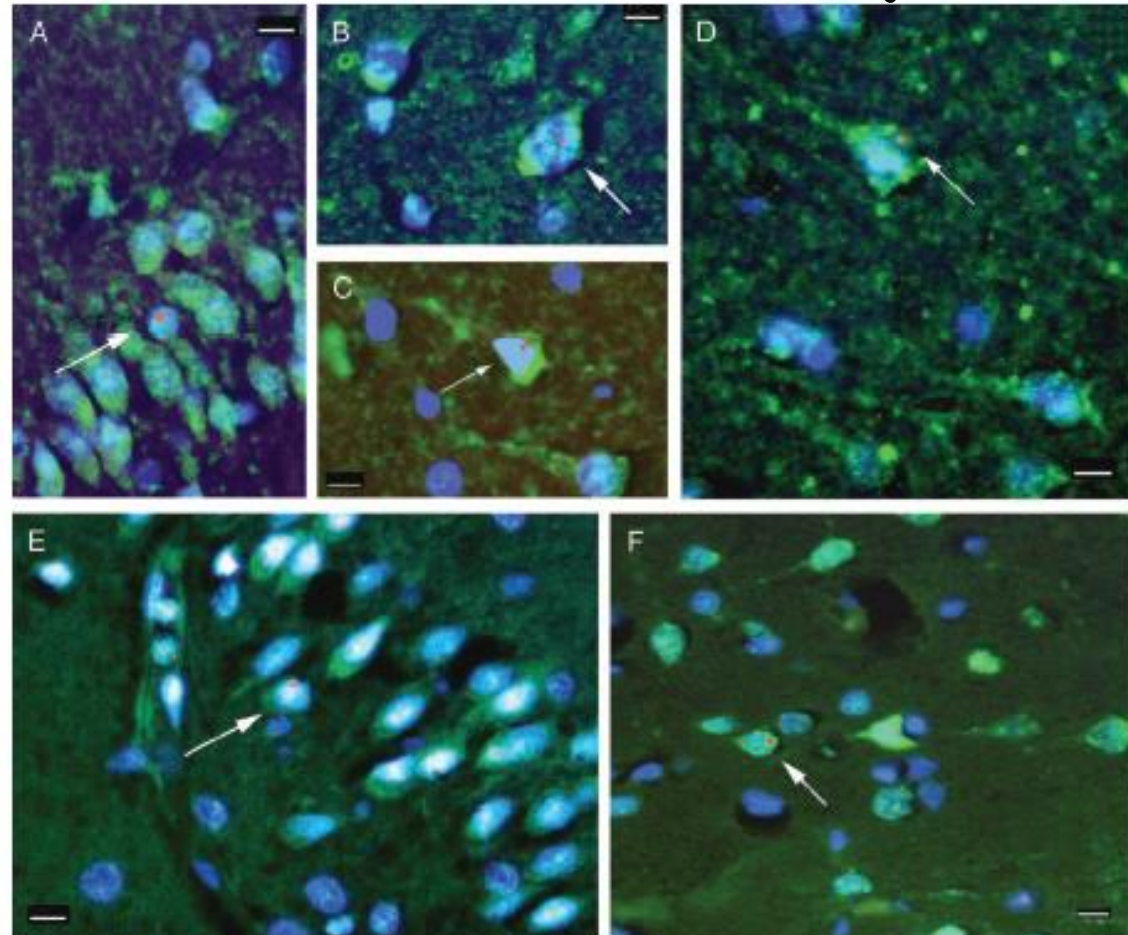


Transplanted bone marrow generates new neurons in human brains

Éva Mezey^{*†}, Sharon Key^{*}, Georgia Vogelsang[‡], Ildiko Szalayova[§], G. David Lange[¶], and Barbara Crain[‡]

- női transzplantátakba férfi donor csontvelő; Y kromoszóma detektálás
- sokféle sejttípus, besugárzott egyedek
- csoportos elhelyezkedés
- magyarázat: stem sejt bejutás és differenciáció, de inkább sejtfúzió

Four female patients who had had bone marrow transplants from male donors were selected from the autopsy files of The Johns Hopkins Hospital. Patient 1 had Omenn's syndrome, was transplanted at 9 months of age, and died 10 months later. Patient 2 had Hodgkin's disease and was transplanted at 34 years of age. Patient 3 had acute lymphocytic leukemia and was transplanted at 10 years of age. Patient 4 had acute lymphocytic leukemia and was transplanted at 20 years of age. Patients 2-4 died within 2 months of receiving their transplants.



Contribution of transplanted bone marrow cells to Purkinje neurons in human adult brains

2088-2093 | PNAS | February 18, 2003 | vol. 100 | no. 4

James M. Weimann^{††}, Carol A. Charlton^{††}, Timothy R. Brazelton^{*}, Robert C. Hackman[‡], and Helen M. Blau^{‡§}

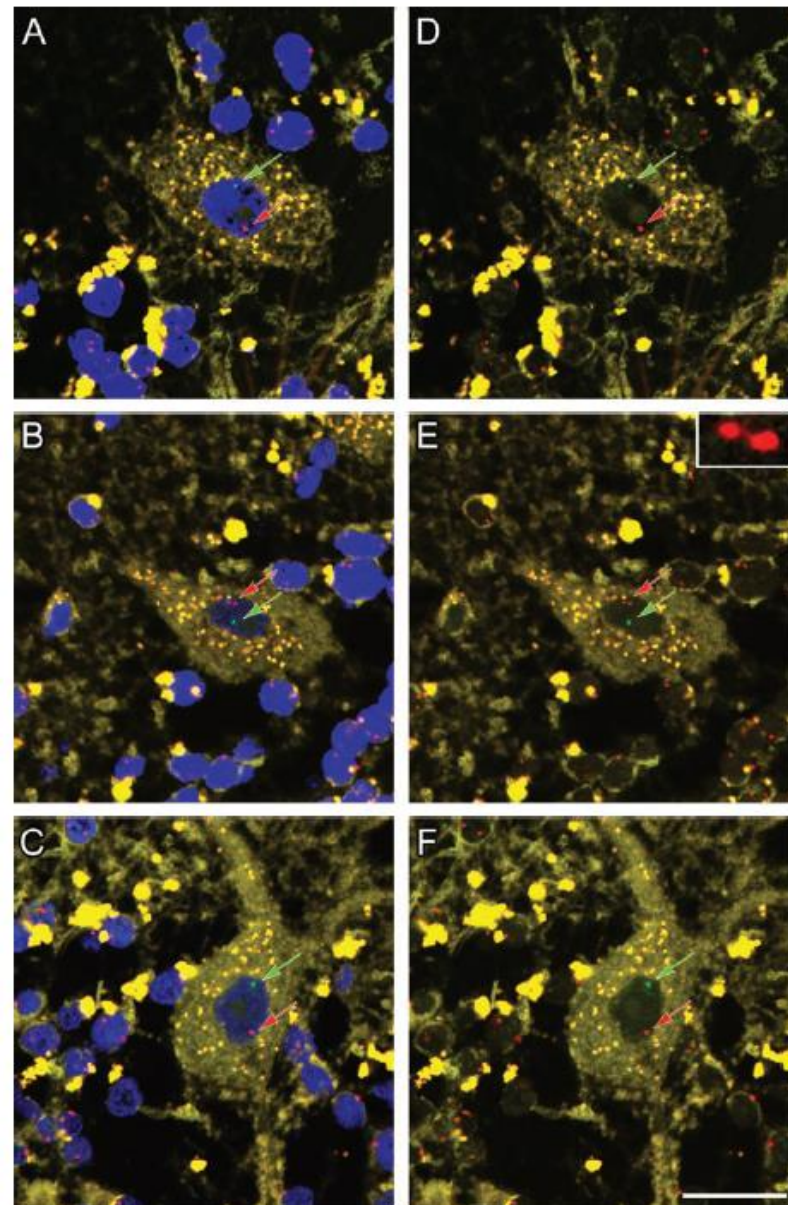


Fig. 3. Evidence of male Y chromosome in Purkinje neurons. (A–C) Three examples of male bone marrow-derived nuclei in Purkinje cell. Each neuron has one X (red arrow) and one Y (green arrow) chromosome. These Purkinje neurons appear to be well integrated into the surrounding cerebellum with a mature morphology including dendrites. (D–F) Same images as A–C with the blue nuclear counterstain removed to highlight the red and green probes. The single X chromosome imaged in B and E has a dumbbell shape, phenomenon observed infrequently. This chromosome is enlarged in the *inset* (E) to demonstrate that it is a single chromosome. Note the twisp of red-labeled chromatin connecting the two lobes that are 1.18 μm apart, whereas the Y chromosome is 3.52 μm from the X. (Scale bar: 20 μm.)

bizonyított sejtfúzió: triploidia

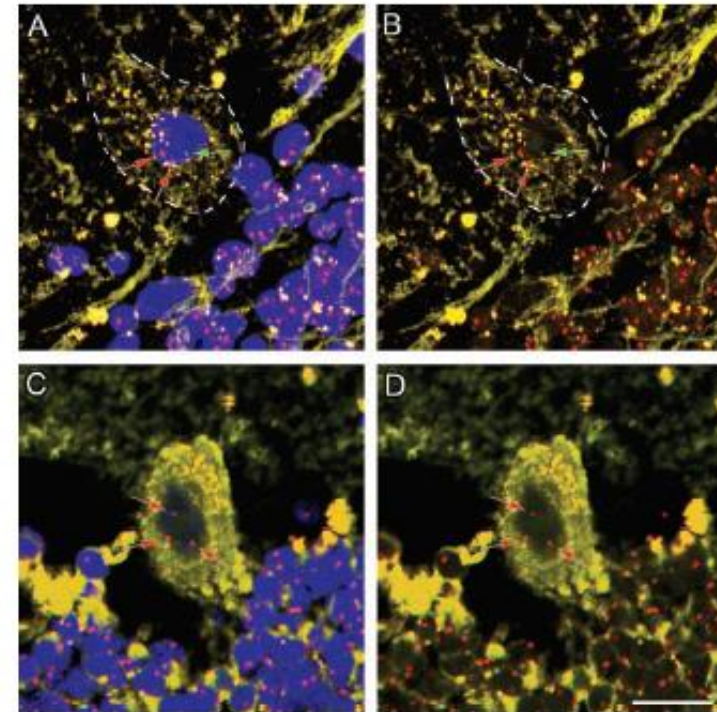
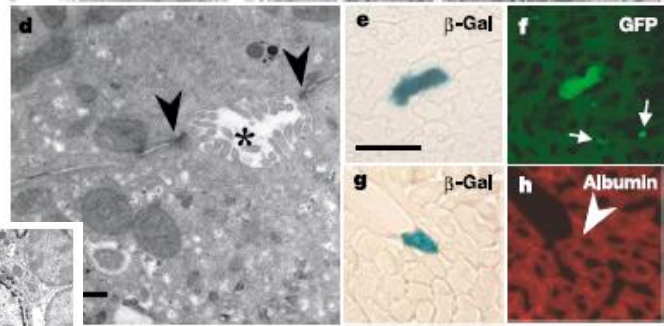
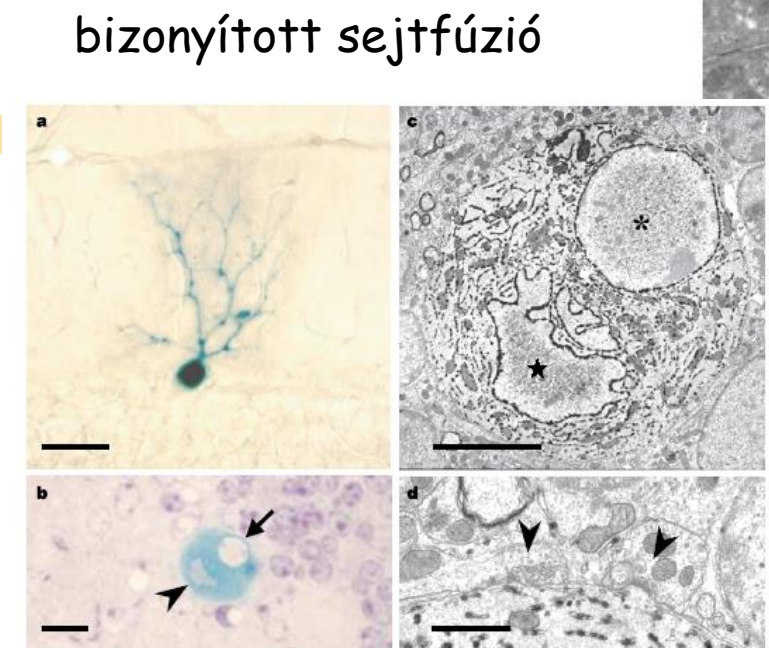
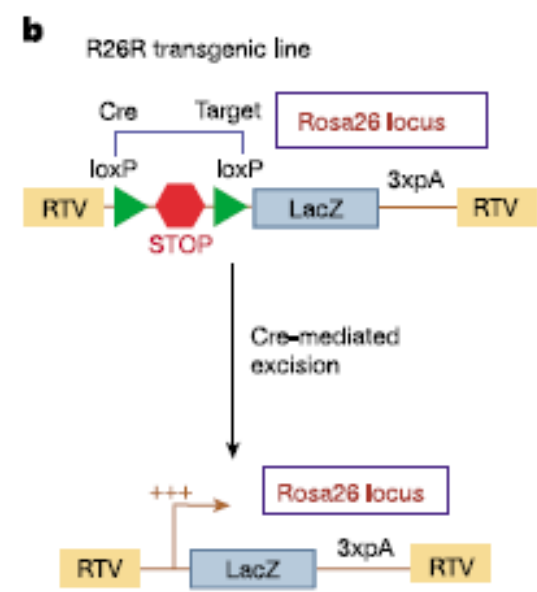
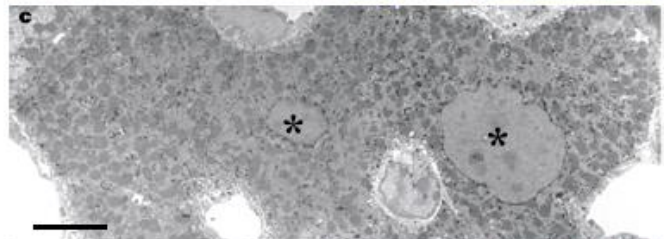
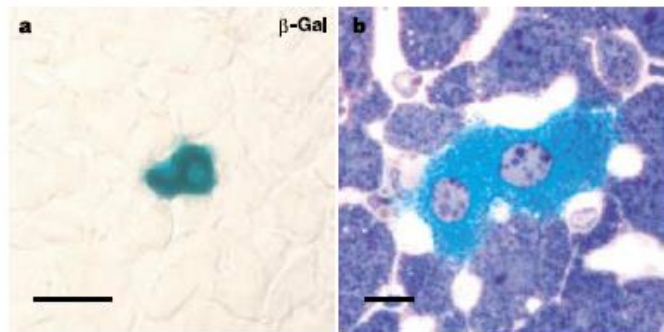
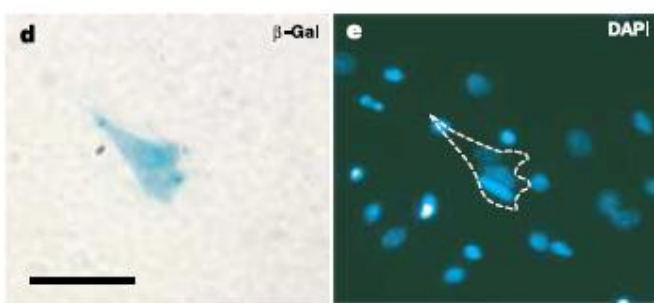


Fig. 4. Evidence for fusion between donor-derived bone marrow cells and host Purkinje neurons. Two examples of triple sex chromosomes in Purkinje neurons. (A) Male to female transplant. There are two X (red) and one Y (green) chromosomes in this cell. (B) Same image as A without the nuclear counterstain. The two X chromosomes are 4.22 μm apart, whereas the Y chromosome is 4.44 μm and 6.08 μm separated from the two X chromosomes. The distance between each chromosome indicates that these are each unique chromosomes. (C) Male to female transplant. There are three distinct X chromosomes (red arrows) in this cell. These chromosomes are 4.16 μm, 6.12 μm, and 4.61 μm apart. (Scale bar: 10 μm.)

Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes

Manuel Alvarez-Dolado¹, Ricardo Pardal², Jose M. Garcia-Verdugo³, John R. Fike¹, Hyun O. Lee², Klaus Pfeffer⁴, Carlos Lois⁵, Sean J. Morrison² & Arturo Alvarez-Buylla¹



az "igazi" klónozás: SCNT

Evidence of a Pluripotent Human Embryonic Stem Cell Line Derived from a Cloned Blastocyst

Woo Suk Hwang,^{1,2*} Young June Ryu,¹ Jong Hyuk Park,³
Eul Soon Park,¹ Eu Gene Lee,¹ Ja Min Koo,⁴ Hyun Yong Jeon,¹
Byeong Chun Lee,¹ Sung Keun Kang,¹ Sun Jong Kim,³ Curie Ahn,⁵
Jung Hye Hwang,⁶ Ky Young Park,⁷ Jose B. Cibelli,⁸
Shin Yong Moon^{5*}

SCIENCE VOL 303 12 MARCH 2004

- humán somatic cell nuclear transfer (SCNT): enukleált petesejtbe a petesejt-donor saját szöveti sejtmagját ültetik vissza
- ~25%-a az embrióknak eljut a blastocysta stádiumba
- SCNT-hES-1 ES-szerű sejtvonal izolálása az ICM-ből
- in vitro és in vivo fejlődés: teratóma képződés in vivo, DNS fingerprint...

....és az igazi nagy gáz

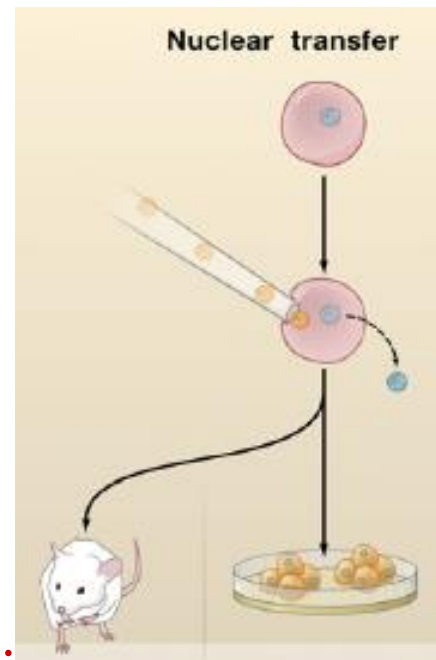
Patient-Specific Embryonic Stem Cells Derived from Human SCNT Blastocysts

Woo Suk Hwang,^{1,2*} Sung Il Roh,³ Byeong Chun Lee,¹
Sung Keun Kang,¹ Dae Kee Kwon,¹ Sue Kim,¹ Sun Jong Kim,³
Sun Woo Park,¹ Hee Sun Kwon,¹ Chang Kyu Lee,² Jung Bok Lee,³
Jin Mee Kim,³ Curie Ahn,⁴ Sun Ha Paek,⁴ Sang Sik Chang,⁵
Jung Jin Koo,⁵ Hyun Soo Yoon,⁶ Jung Hye Hwang,⁶
Youn Young Hwang,⁶ Ye Soo Park,⁶ Sun Kyung Oh,⁴ Hee Sun Kim,⁴
Jong Hyuk Park,⁷ Shin Yong Moon,⁴ Gerald Schatten^{7*}

SCIENCE VOL 308 17 JUNE 2005

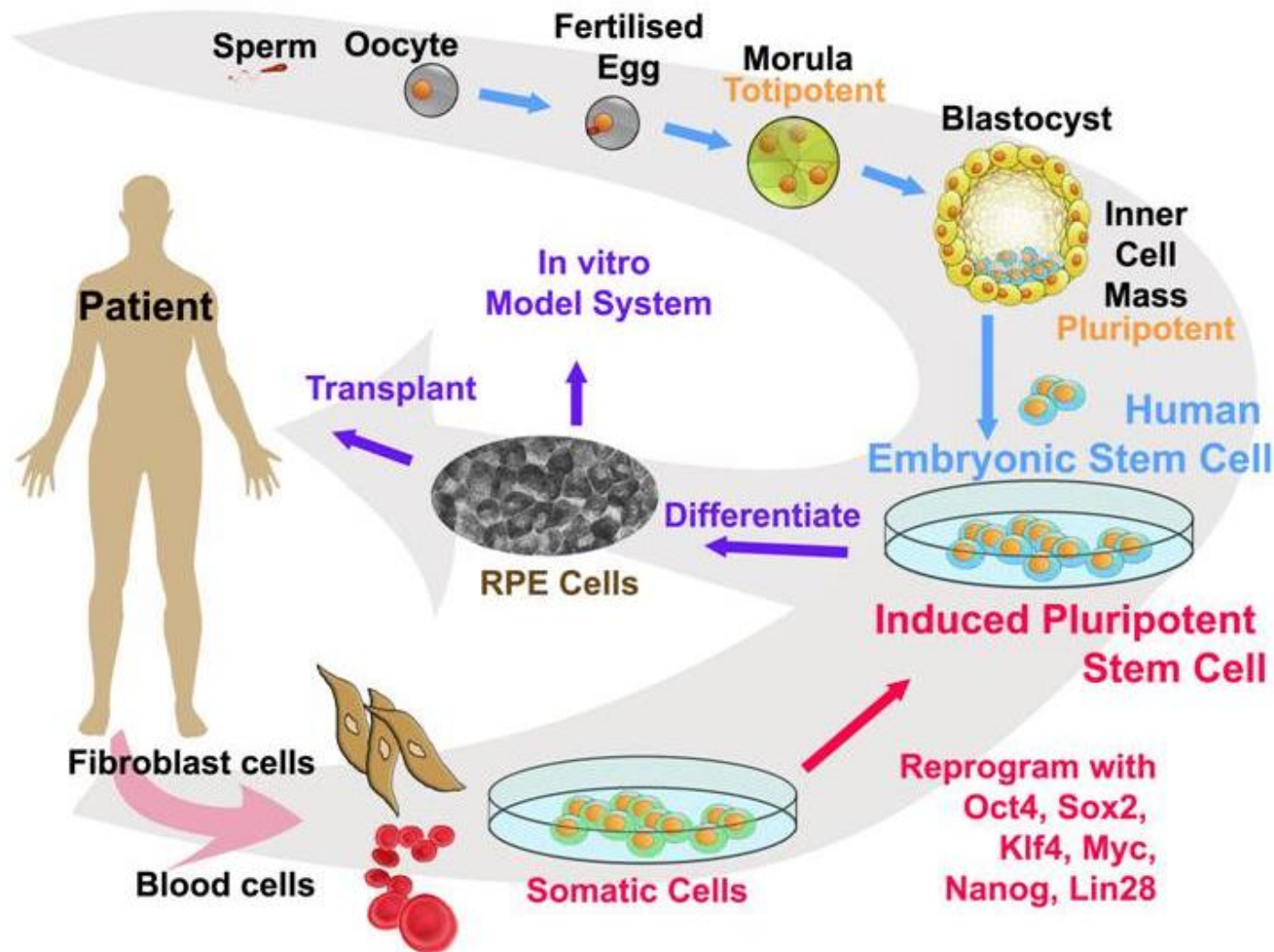
- humán somatic cell nuclear transfer (SCNT): 11 sejtvonal idegen donor sejtmaggal (NT-hSC sejtvonalak)

valószínűleg partenogenetikus (szűznemzés) eredet + hamisítás....



induced Pluripotens Stem sejt (iPSs)

- első közlemény 2006-ban, Nobel díj 2012-ben [Yamanaka; Gurdon- 1958!]
- egér / humán, embrionális / felnőtt fibroblasztok "újraprogramozása"



Klinikai alkalmazások problémái

biztonság

- spontán tumorok kialakulása ↔
- beültetés előtti ESC differenciáció, szelekció
- proliferációban fontos gének kiütése
- N-oleoil-serinol (S18): osztódó sejtek ellen
- túl sok normál sejt beadása? (ld. dopamin-termelő sejtek beültetése Parkinsonos betegekbe)
- beültetett sejttípus definiálása
 - izolálás, tenyésztés standardizálása; markerek
 - feeder layer - más fajból
 - szérum vs. definiált faktorok
- klinikai I/II fázis: humán ES-eredetű sejtekkel csak >15 év után!

<http://www.clinicaltrials.gov/>

Klinikai alkalmazások problémái

beültetett sejttípusok tisztítása

- vizuális marker, gradiens centrifugálás - nem megbízható
- FACS, MACS (magnetically activated cell sorting) - kis kapacitás, markerek?
- genetikai szelekció - elvileg nagy tisztaság, de az exogén szelekciós gén további kockázat

beültetett sejtek mennyisége, a graft mérete

- sejtpusztulás, túlélés aránya
- sejtproliferáció - a befogadó szövetre is hat! (fibrózis, gliózis)

hegszövet képződése

- még a kialakulása előtt meg kell(ene) akadályozni

Klinikai alkalmazások problémái

transzplantációs technikák, vizsgálatok

- kísérletekhez xenotranszplantáció (emberi ESC beültetés állatba)

ideálisan: 1) recipiens jó befogadó legyen
2) jó betegség-modell legyen
3) élettani tényezők az emberéhez hasonlítsanak
4) gyors, hatékony vizsgálatok

kutya, disznó, birka, emberszabásúak vs. egér

- allotranszplantáció (állati ESC beültetés állatba)
egyelőre hatékonyabb.....
- autológ transzplantáció (saját ESC)

Klinikai alkalmazások problémái

kilökődés: ESC-n kevés MHC1, MHC2 hiányzik ↔ differenciációval jelentősen nő

- immunszuppresszió
- lokálisan termeltetett, immunrendszert gátló anyagok (indolamin dioxigenáz, Trp degradáció, trophoblast sejtek)
- stem cell bank
- homozigóta HLA; "általános donor" ESC (pl. partenogenetikus embrió, pESCs)
- HLA szuppresszió ↔ NK sejt aktiváció
- vérképzőszervi kimérizmus: csontvelő-transzplantáltak a donortól való szervátültetést jól fogadják

etikai szempontok (hES sejtek esetében):

- teljes tiltás: G, A, I, F, Gr, Ire, P, NL, USA (Bush-kormány)
- rel. szabad, kivéve a regeneratív klónozást: UK, S + F, B
- új sejtvonal előállítása tilos: Svájc

Össejtek és etikai megfontolások: szabadalmaztatható-e az össejt?

Table 1. What Is Patentable and What Is Not in the US and Europe

	Nonpatentable	Patentable
United States	<ul style="list-style-type: none">• Human-nonhuman chimeras	<ul style="list-style-type: none">• Isolated/purified embryonic stem (ES) cells, including human ES cells• Methods of deriving ES cells• Culture conditions for ES cells• Processes for differentiating ES cells• Genetic transformation and nuclear transfer for altering ES cells
Europe	<ul style="list-style-type: none">• Processes for extracting stem cells from human blastocysts• Direct destruction of human embryos• Available human ES cell lines and their use (if destruction of human embryos was involved)*	<ul style="list-style-type: none">• Adult human stem cells and their use• Stem cells derived from nonhuman animal embryos and their use
United Kingdom	<ul style="list-style-type: none">• Processes for obtaining stem cells from human embryos• Human totipotent cells with the potential to develop into an entire human body	<ul style="list-style-type: none">• Human embryonic pluripotent stem cells

*This point is under consideration with the WARF case currently before the Enlarged Board of Appeal of the European Patent Office. (Source: Erich E. Veitenheimer, a partner with the Washington DC-based Cooley Godward Kronish LLP)

- 2011, EU: szabadalmi tilalom
- nincs korlátozás / szabályozás: Kína, India, Dél-Korea, Izrael

Össejtek a klinikai alkalmazás szempontjából

endogén őssejtek aktiválása

- döntő a stem sejt mikrokörnyezet (fiatal - öreg keringési rendszer parabiózis)
- szisztémás vagy lokális drog-kezelés szükséges

mezenchimális őssejtek (MSCs)

- elsősorban induktív szignálokat termenek sérülés hatására, de magába a szövetbe nem integrálódnak

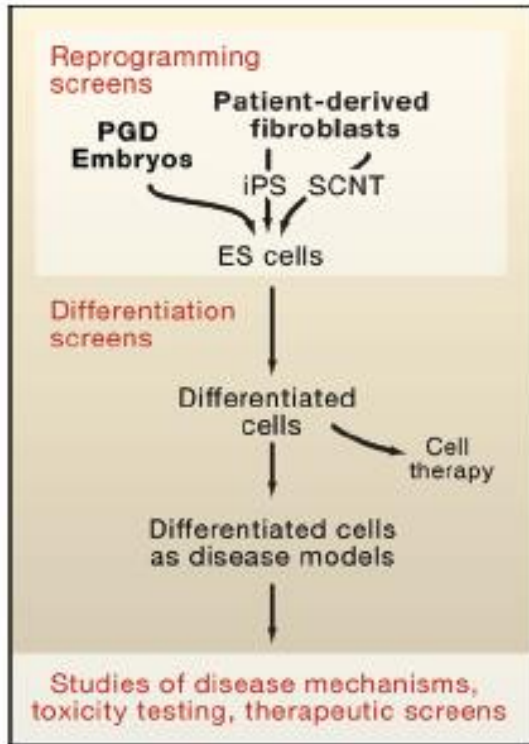
SCNT (ntESCs): somatic cell nuclear transfer; szöveti sejt sejtmagjának transzplantációja ("klónozás")

- gyakori fejlődési rendellenesség, csökkent élettartam
- technikai / etikai nehézségek

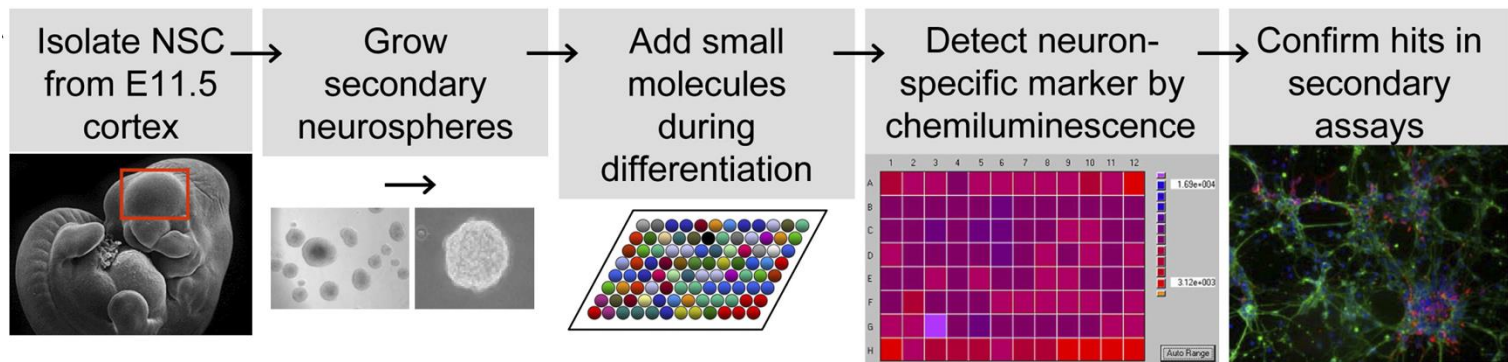
iPSs reprogramming

- nincs kilökődés, egyed-specifikus
- limitált etikai problémák (petesejt, zigóta)
- retrovirus használata, mutáció, tumorigenitás - megoldva???
- korlátozott kapacitás, drága

őssejtek és a gyógyszerkutatás / regeneratív orvoslás: business matters



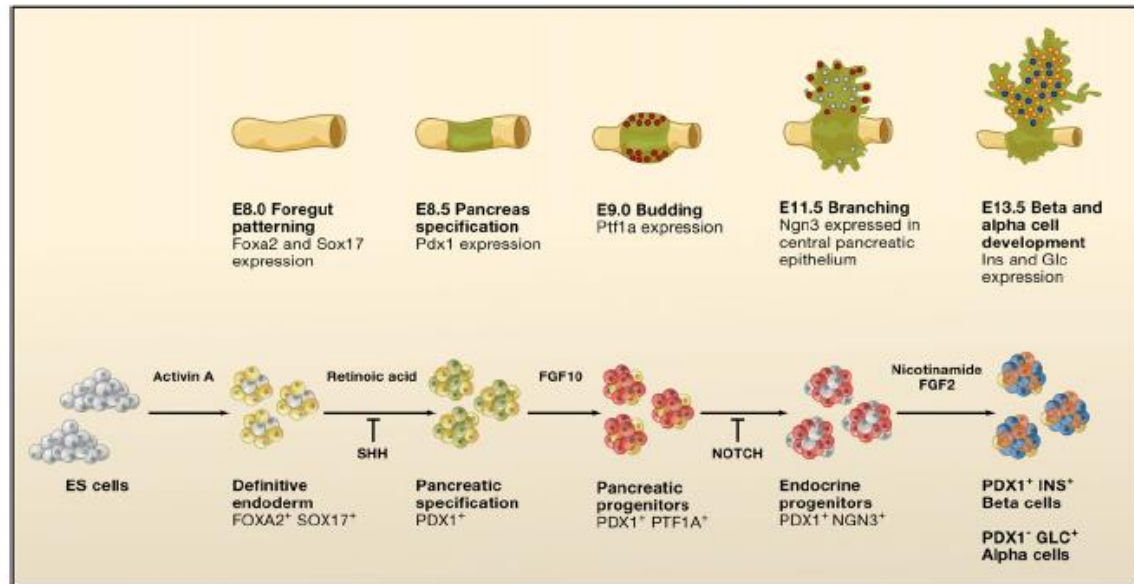
- differenciációs screen: reporter gének (pl. GFP - izom specifikus promoterral)
- "bioaktív gyűjtemények": 1500 - 5000 kismolekula, csak részben feltárt hatásokkal
- adott irányba differenciáltatott sejtpopuláció vizsgálata



őssejtek és a gyógyszerkutatás / regeneratív orvoslás: business matters

- őssejt-terápia és sejtpótlás „iparilag” - a személyre szabott terápia [egyelőre?] messze túl drága a rutinszerű alkalmazáshoz

- inzulin-termelés



- mezenchimális stem sejtek: autoimmun / graft versus host immunreakció; csont- és porcképzés

- szívizom

- bőr- és ér-pótlás

- vörösvértest és vérlemezke

őssejtek és a gyógyszerkutatás / regeneratív orvoslás: business matters

- reprogramming kit, iPS sejtvonalak, tápok:
Invitrogen Life-Technologies (www.invitrogen.com),
Stemgent (www.stemgent.com),
ReproCELL (www.reprocell.net),
R&D Systems (www.rndsystems.com),
Promega (www.promega.com),
Miltenyi Biotec (www.miltenyibiotec.com)
STEMCELL Technologies (www.stemcell.com)
- humán iPS-ből származó kardiomiciták „gyártása” toxicitási tesztekhez
cellular dynamics international (CDI; www.cellulardynamics.com)
- „Catalyst” program: pénzért adják az iPS technológiát
Stemgent
Fate Therapeutics
- iPS felhasználás terápiás célokra: alapvetően csak potenciális drogok
tesztelésére !
iPierian (www.ipierian.com) : in vitro screening
Fate Therapeutics (www.fatetherapeutics.com) : endogén őssejtek aktiválása

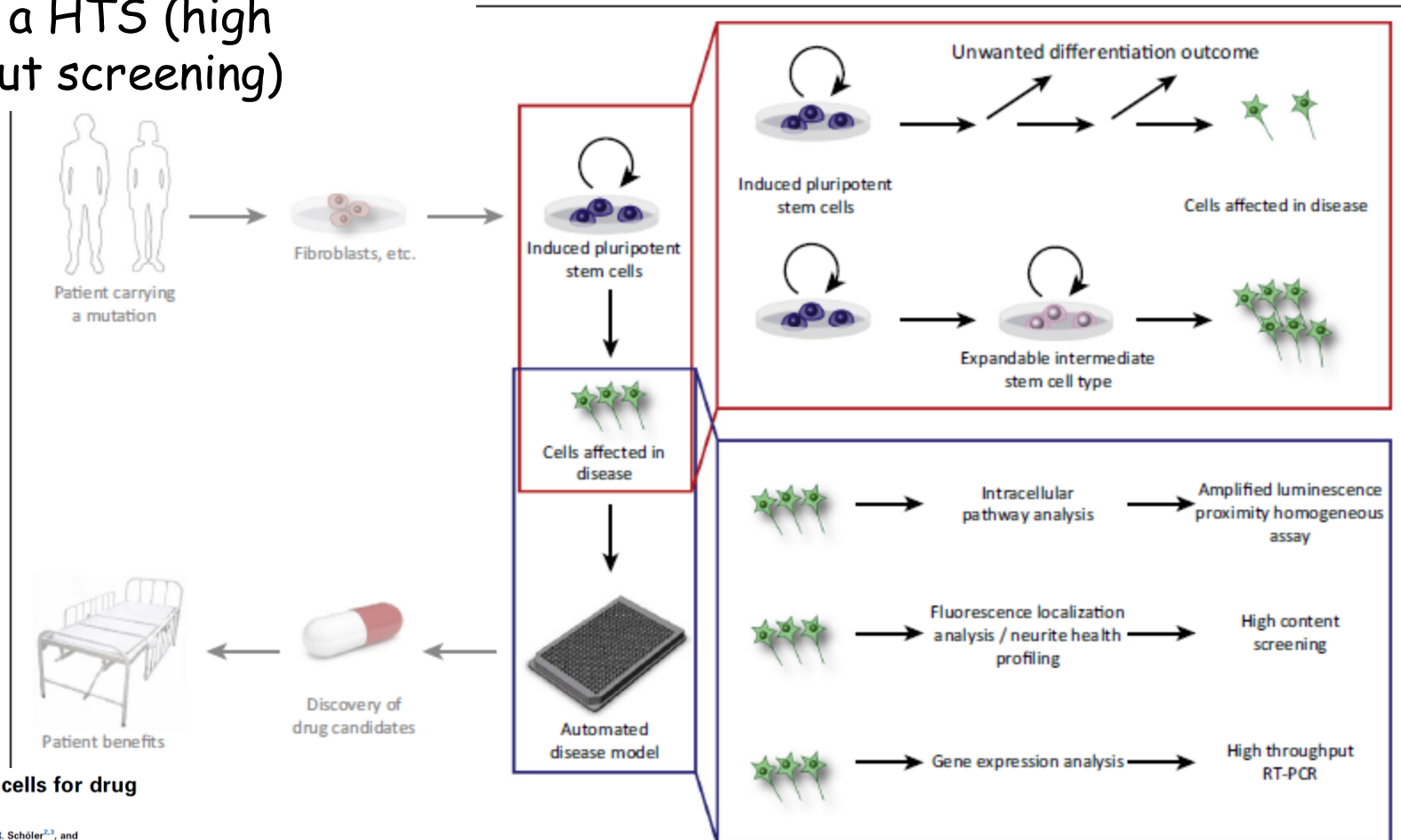
The business of exploiting induced pluripotent stem cells

Catherine Prescott

Phil. Trans. R. Soc. B 2011 **366**, 2323-2328
doi: 10.1098/rstb.2011.0047

őssejtek és a gyógyszerkutató / regeneratív orvoslás: business matters

- az iPS és a HTS (high throughput screening)



iPS cell derived neuronal cells for drug discovery

Ralf Heilker¹, Stefanie Traub¹, Peter Reinhardt², Hans R. Schöler^{2,3}, and Jared Sternecker²

Trends in Pharmacological Sciences October 2014, Vol. 35, No. 10

TRENDS in Pharmacological Sciences

Figure 1. Overview. Induced pluripotent stem (iPS) cells are generated from primary somatic cells, such as fibroblasts, that are biopsied and cultured from patients with an observable phenotype and known genotype. iPS cells can then be expanded and differentiated to generate theoretically limitless numbers of specialized cells that should recapitulate pathogenic mechanisms in patients. In principle, these models can be incorporated into high throughput screening (HTS) campaigns to identify novel therapeutic compounds that can be developed into new drugs. Although many iPS cell based disease models have been published, there are at least two challenges that need to be addressed in order to use these models for HTS. First, as outlined in red, iPS cell differentiation requires up to several months and gives heterogeneous results (top). We review the use of expandable intermediates as a possible solution (bottom). Second, as shown in the blue box, disease models have to be converted into HTS-compatible assays. We review the three possible HTS-compatible platform technologies that can be applied to iPS cell based disease models: amplified luminescence proximity homogeneous assay (top), high content screening (middle), high throughput reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR) (bottom).