

Klónok és őssejtek: A genetikai újraprogramozás rejtelmei

2013. Feb 20, Radnóti Miklós Gimnázium, Budapest



Universiteit Utrecht

Prof Dr Dinnyés András
Szent István Egyetem, Gödöllő
Utrecht University, The Netherlands
BioTalentum Kft, Gödöllő



Radnóti évek

1980-84



Egyetem és Fulbright at the “Smithsonian Institution, National Zoo, Washington DC.

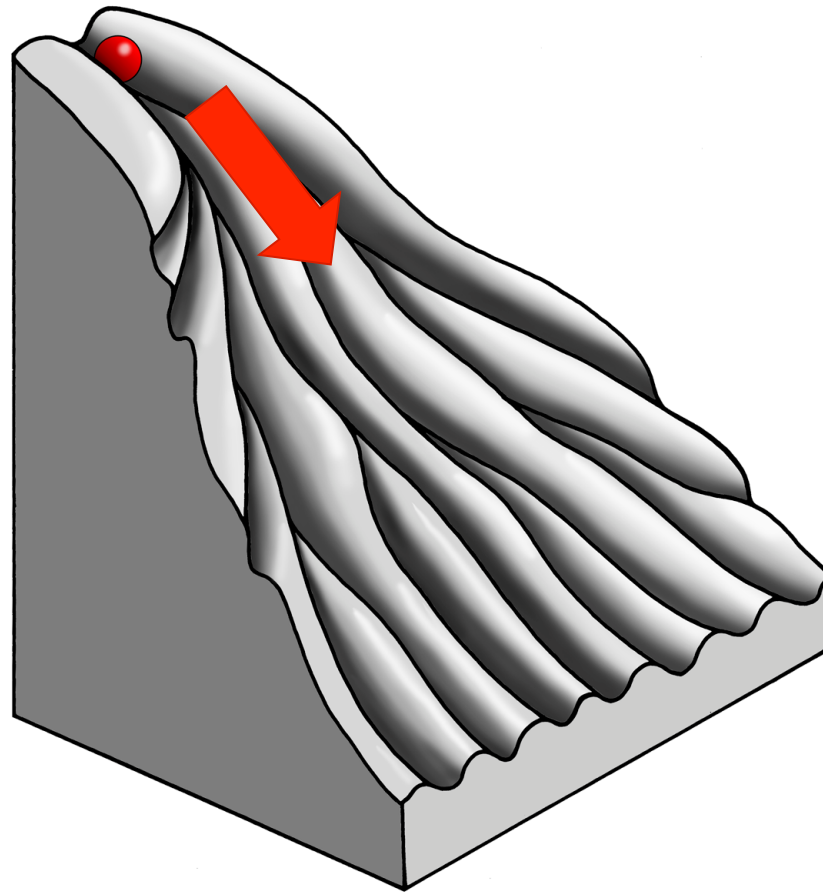




Vándorévek

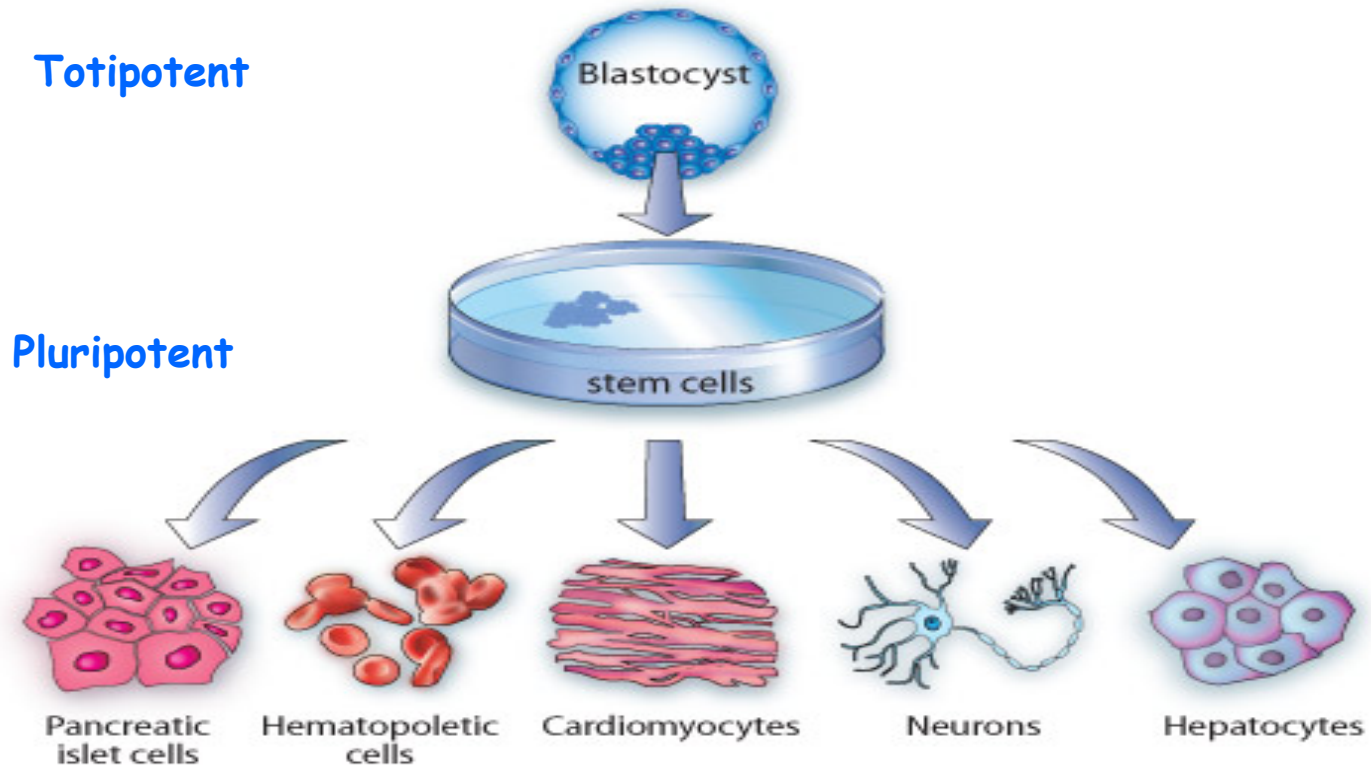


The landscape model of mammalian cell differentiation



Waddington-model, modified from Keeton & Gould 1984

Embryonic stem cells are isolated from the inner cell mass of blastocysts and ES cell lines are generated



(Illustration by Cell Imaging Core of the Center for Reproductive Sciences)

"for their discoveries of principles for introducing specific gene modifications in mice by the use of embryonic stem cells"



Mario R. Capecchi



Sir Martin J. Evans



Oliver Smithies

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2007



Pluripotent ES cell characteristics

- - Unlimited cell division
- - Unlimited cell renewal
- - Pluripotency in In vitro culture
- - Can be differentiated into all three germ layers
 - In vitro: tissue replacement, transplantation therapy, in vitro test systems
 - In vivo: chimera formation
- - Germline chimerism - KO animals (the Nobel prize story)

Sejtmagátültetés: eredmények és dogmák



Sir John B. Gurdon

Born: 1933, UK

Gurdon Institute, Cambridge

Prize motivation:

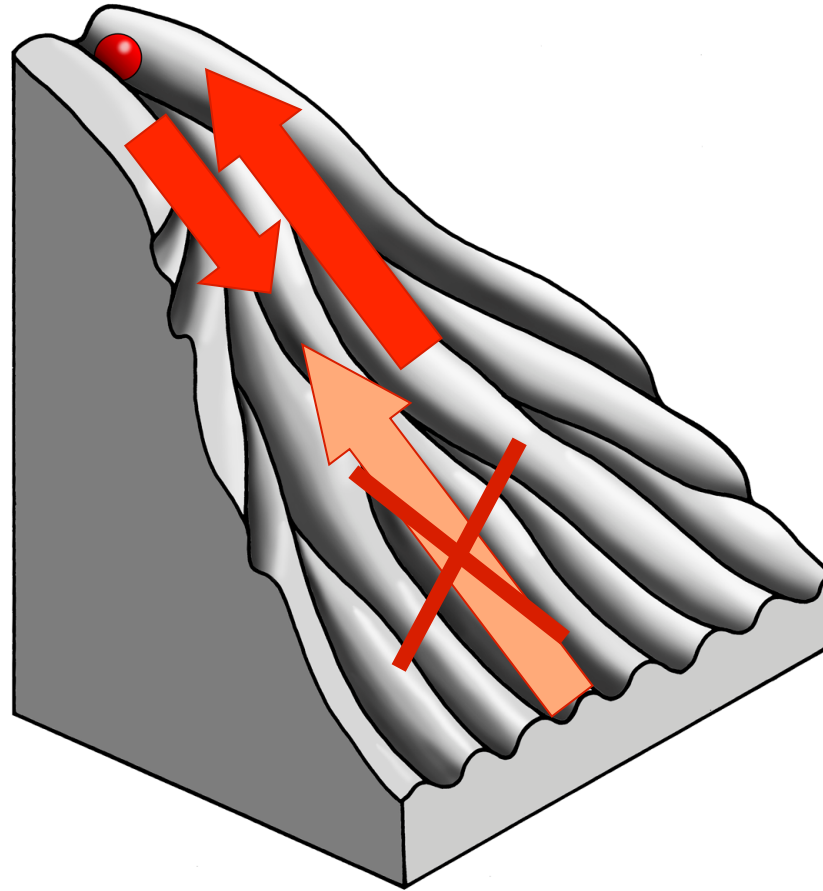
"for the discovery that mature cells can be reprogrammed to become pluripotent"



Gurdon et al. (1958) *Nature*

The Nobel Prize in Physiology or Medicine 2012

The landscape model of mammalian cell differentiation



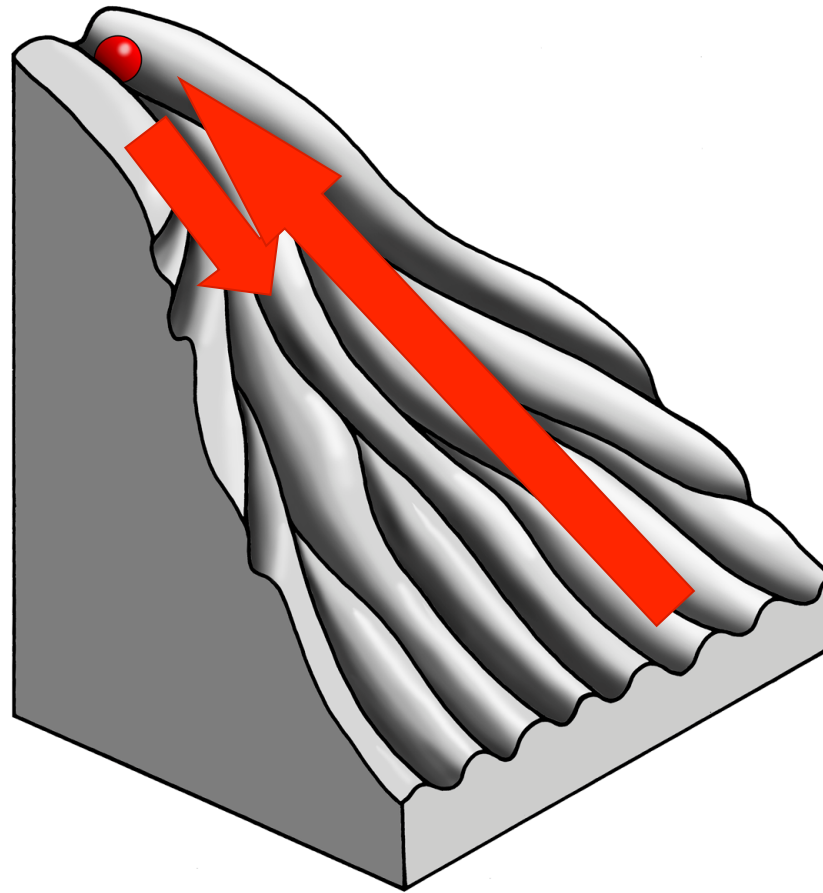
modified from Keeton & Gould 1984

Felnőtt testi sejtes magátöltetés sikere emlősökben

- 1997 February: Birth of Dolly the sheep announced, the first mammal to be cloned by nuclear transfer from adult cells.
(*Sir Ian Wilmut, Keith Campbell, Bill Ritchie*)
- 1997 October: Birth of Cumulina, the first cloned mice. Died in May 2000, having raised two litters of her own and having lived for 31 months – 95 in mouse years.



Post-Dolly mammalian cell differentiation



modified from Keeton & Gould 1984

Dolly and her baby;
Cumulina and two generations:
normal reproductive potential
& perfectly healthy 2nd generation!?



What nuclear transfer is **not** good for?

(of course, in focus of most media attention)

- Human **reproductive** cloning
- Bringing back Tasmanian tigers or Mammoths
- Revolutionary changes in agriculture



What nuclear transfer might be **good** for?

- Basic science for genetic reprogramming, epigenetic changes and **functional genomics**
- Major improvements in **medical animal models**
- Human **therapeutic** cloning
- Gene banking for endangered breeds and species
- Economically beneficial methods in agriculture

First Hungarian clones



„Klonilla” Nov 2006



**„Tapsilla”
May 2007**

Meng et al, Cloning and Stem Cells, 2008,10:429-434

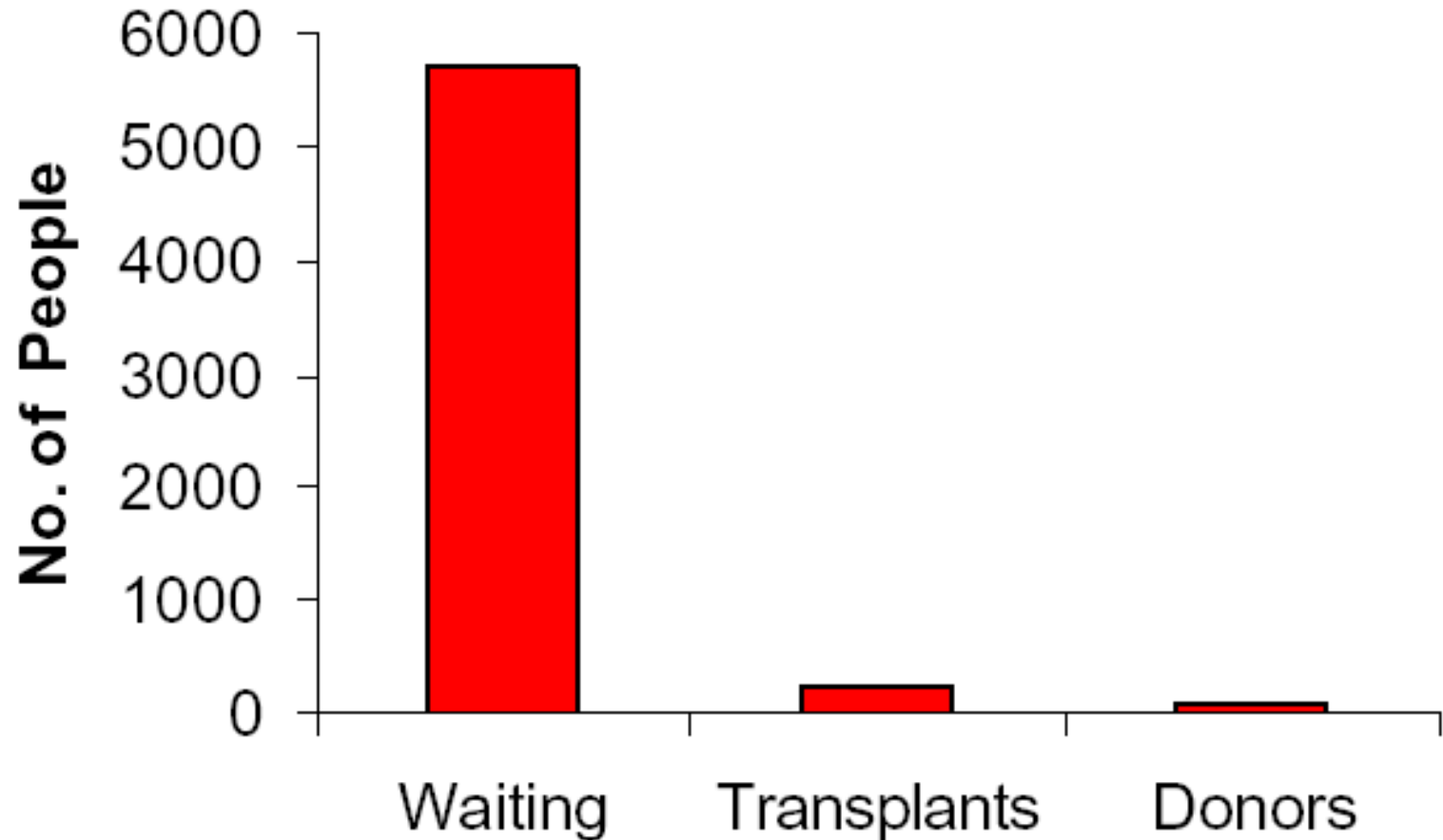
Meng et al, Cloning Stem Cells 2009,1:203-208

Genetically modified pigs as disease models

- Disease such as Alzheimer (produced by SC NT in Denmark), diabetes (Munich)
- Vasculatory system
- Digestive system (cancer etc)
- Stem cell studies for in vitro models

Xenotransplantation

Using Animal Organs for Transplantation into Humans



UK Transplant support service authority

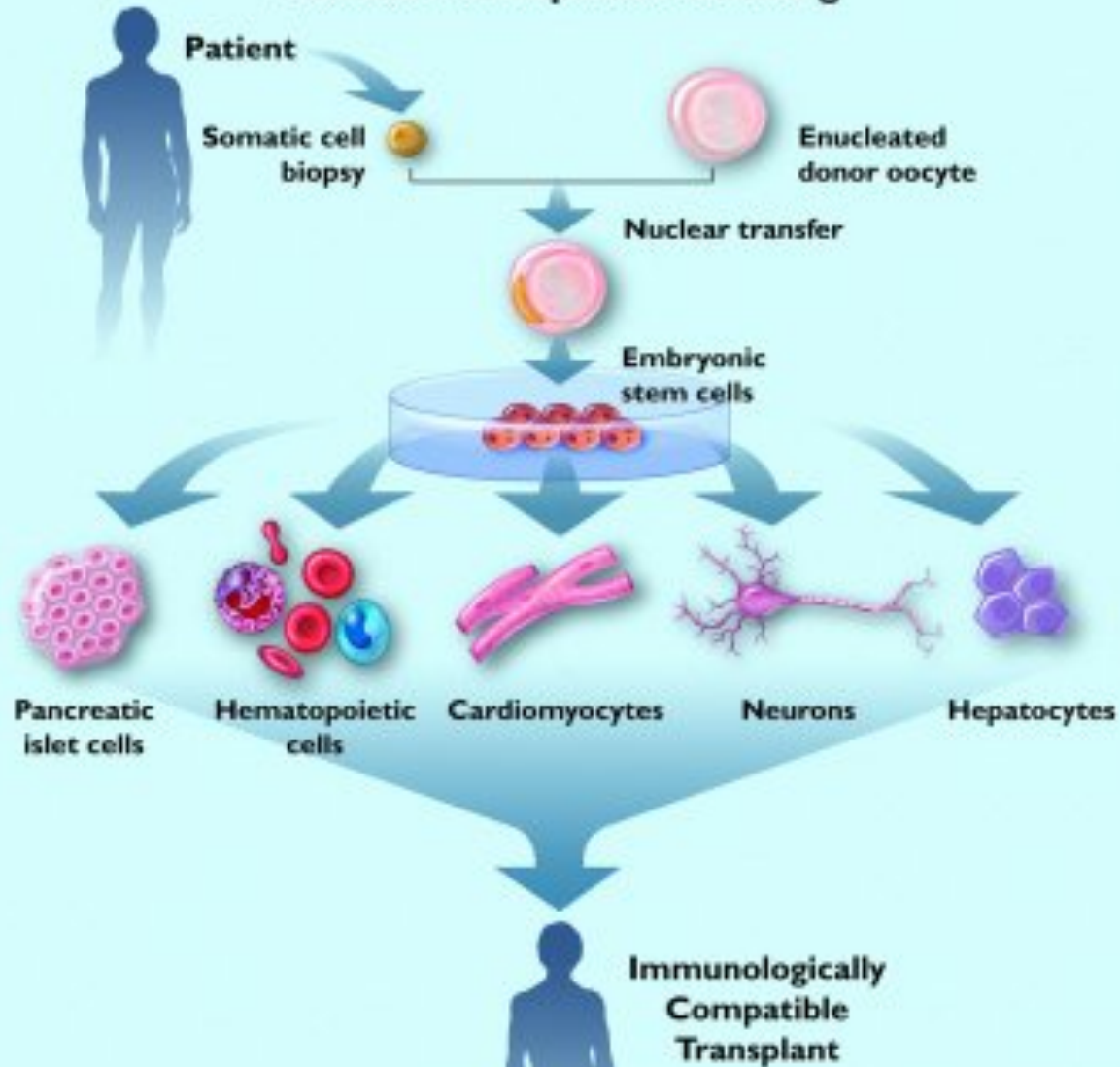
Pigs for xenotransplantation

- or disease risk of endogenous retroviruses?

First therapeutic proteins produced by cloned farm animals

- Pharming, Leiden (formally GenPharm)
 - Cloned transgenic cow milk for recombinant human fibrinogen (rhFIB)
 - Recombinant human C1 inhibitor

Human Therapeutic Cloning

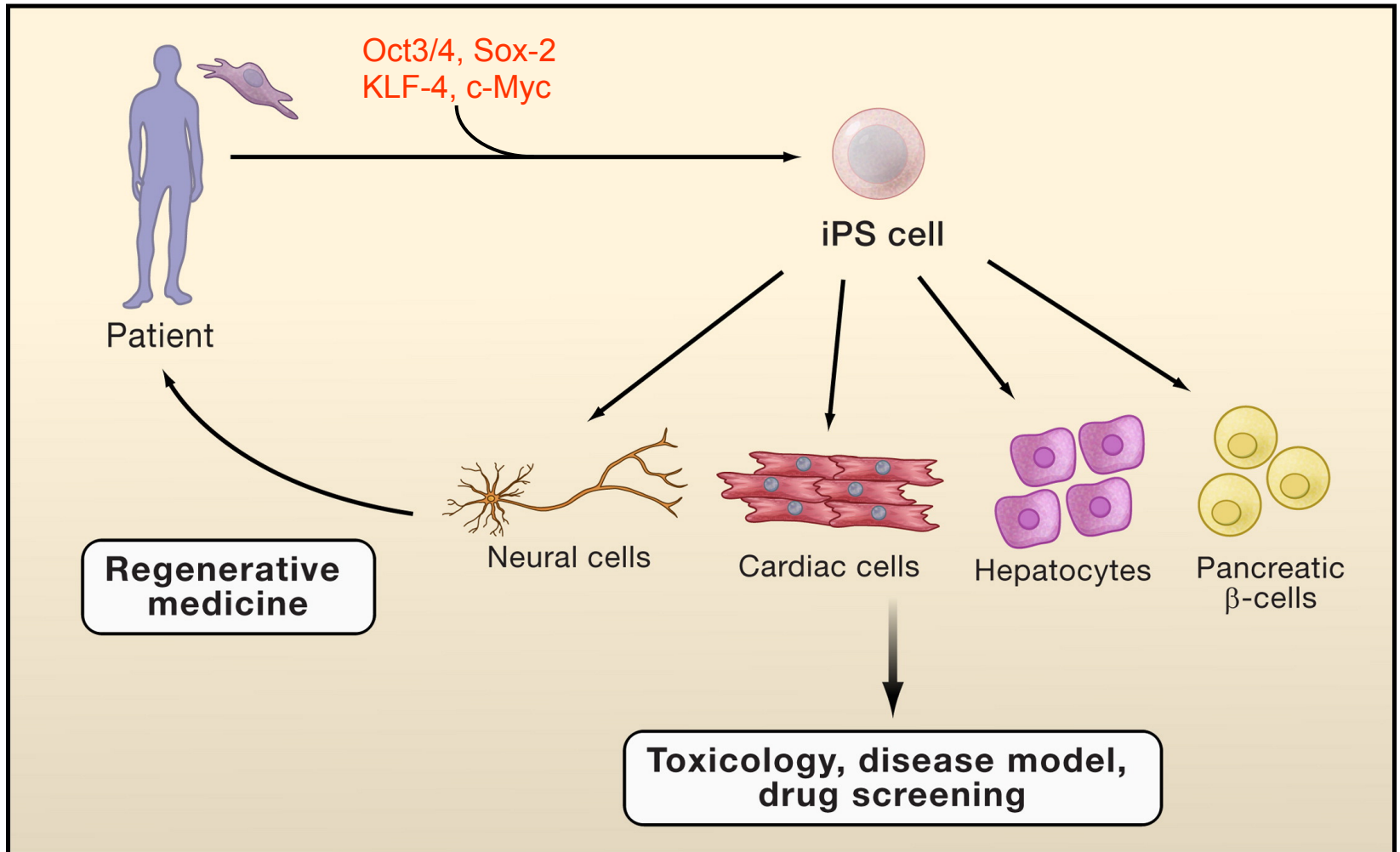


Noggle et al., “Human oocytes reprogram somatic cells to a pluripotent state,” *Nature*, 478:70–75, 2011.

Újabb áttörés: iPS sejtek

Shinya Yamanaka Born: 1962, Japan
Kyoto University

- induced pluripotent stem cells (iPS) in mouse and human (2006, 2007)
 - might replace ES or therapeutic cloning sources for patient specific regenerative cells
 - ethically acceptable
 - high risk initially (viral gene transfer systems, uncontrolled gene insertions)



Possible treatments with tissues derived from stem cells

Cell type	Target disease
Neural cells	Stroke, Parkinson's disease, Alzheimer's disease, spinal cord injury, multiple sclerosis
Heart muscle cells	Heart attacks, congestive heart failure
Insulin-producing cells	Diabetes
Cartilage cells	Osteoarthritis
Blood cells	Cancer, immunodeficiencies, inherited blood diseases, leukaemia
Liver cells	Hepatitis, cirrhosis
Skin cells	Burns, wound healing
Bone cells	Osteoporosis
Retinal (eye) cells	Macular degeneration
Skeletal muscle cells	Muscular dystrophy

Személyre szabott orvoslás: Beteg specifikus sejtvonalak?

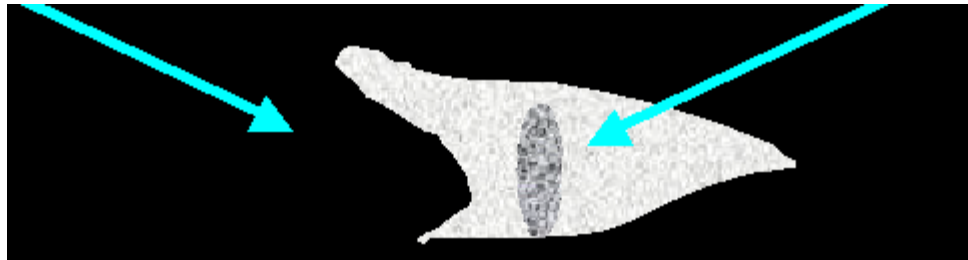
- immuntolerated regenerative cells (MEA regulation in EU – very strict, blocking progress and prevent failures)
- **drug development** combined with genetic stratification of patient groups – to increase the chances of drugs to pass FDA
- **Toxicity tests** (cardiac, liver, endothel cell types) from various patient genetic backgrounds-stratified toxicity data.

Fő kérdés: Mi a sejtek „differentiációs rugalmasságának” valódi határa?

Enhance potential of transdifferentiation of somatic cells or adult stem cells for human cell therapy

Extra-cellular
factors

Intra-cellular
factors



Remove inhibition?
Direct change ?

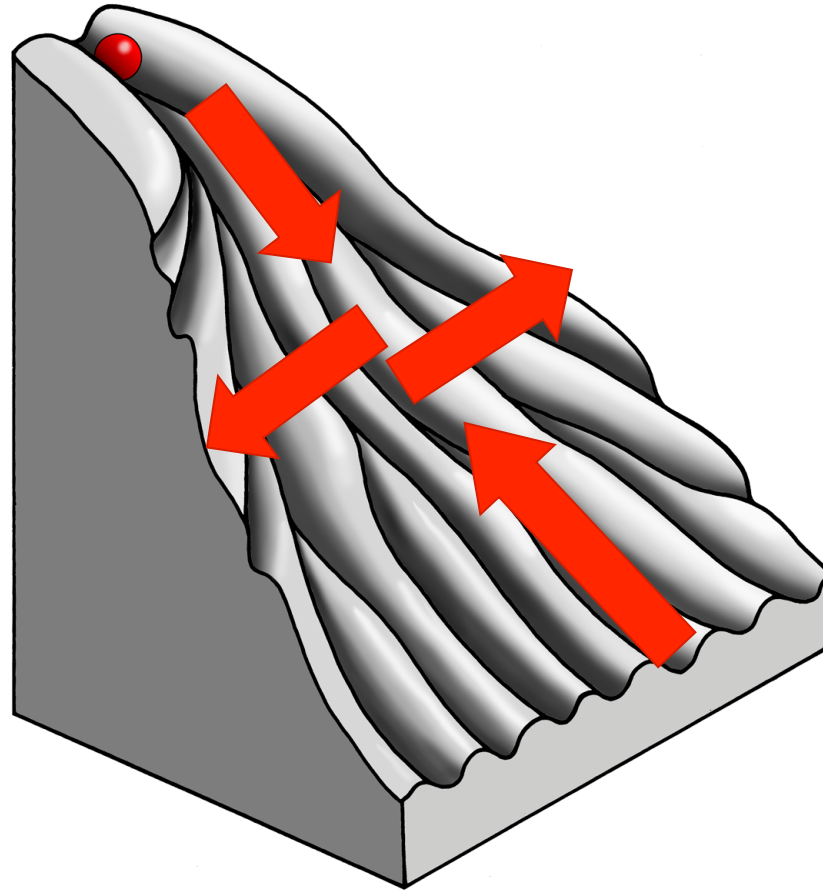
Remodeling complexes ?
Epigenetic modifications?

Direct conversion of fibroblasts to functional neurons by defined factors

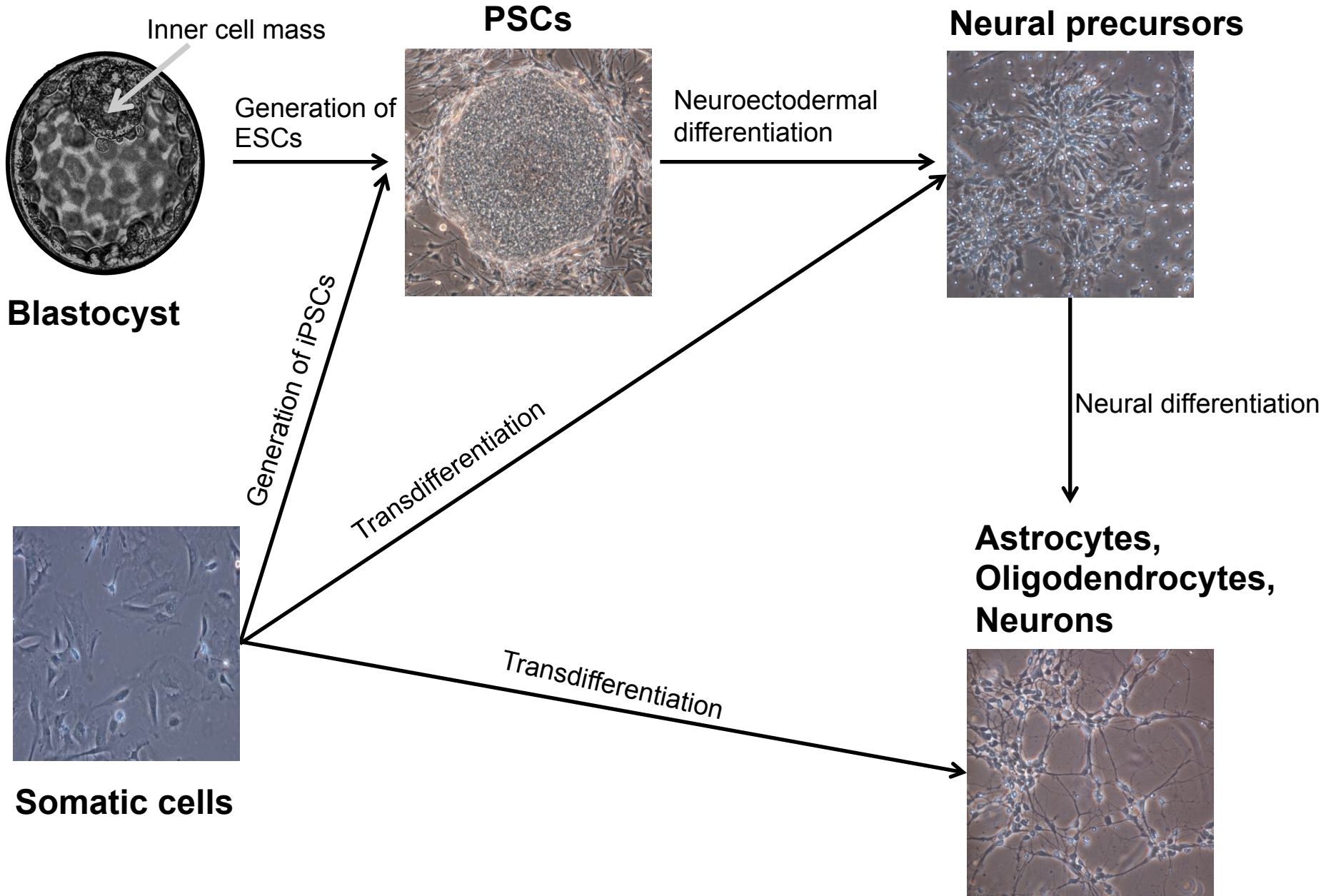
Thomas Vierbuchen, Austin Ostermeier, Zhiping P. Pang, Yuko Kokubu, Thomas C. Südhof³
& Marius Wernig *Nature* **2010** |

..a combination of **only three factors**, *Ascl1*, *Brn2* (also called *Pou3f2*) and *Myt1l*, that suffice to rapidly and efficiently convert mouse embryonic and postnatal fibroblasts into functional neurons *in vitro*. These **induced neuronal (iN) cells express multiple neuron-specific proteins, generate action potentials and form functional synapses.**

Mammalian cell differentiation with trans-differentiation



modified from Keeton & Gould 1984



Mezenchimális őssejtek felhasználhatósága:

Fő sejtforrás: Csontvelő
Zsírszövet
Köldökzsínór

Előnyük: könnyű hozzáférhetőség
tenyésztethetőség
allogén esetben sem váltanak ki
súlyos immunválaszt
(nincs kilökődés)

Potenciális felhasználhatóság:
sejt pusztulással járó betegségek gyógyításában
([210 ongoing studies in clinicaltrials.gov](https://clinicaltrials.gov))

- Graft vs Host betegség (25 studies)
- Cukorbetegség (20 studies)
- Szívinfarktus (14 studies)
- Neurodegeneratív kórképek (11 studies)
- Retina degeneratív betegsége (1 study)
- Gerinc sérülések (6 studies)
- Tüdőfibrozis (1 study)
- Porc-csont sérülések (15 studies)
- Máj károsodás (6 studies)

Összetett hatásmechanizmus:

- regenerációhoz szükséges **faktorok termelése**
- **immunszuppresszív** aktivitás
- saját őssejt populáció mozgósítása
- közvetlen beépülés, **differenciálódás**

Embrionális Őssejtek felhasználhatósága:

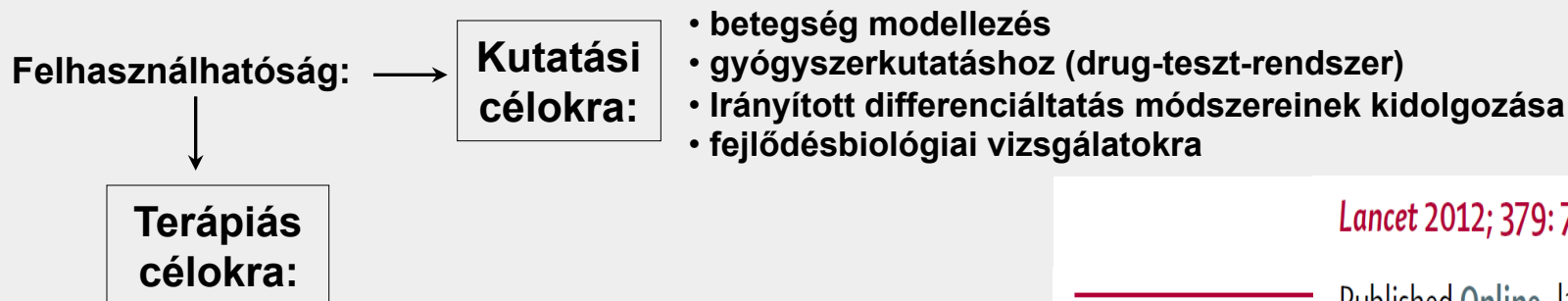
Fő-sejtforrás: Blasztociszta

Hátrányuk: daganatképző hajlam

nehéz hozzáférhetőség (Etikai aggályok)

tenyésztetőség nagyfokú körültekintést igényel

terápiás alkalmazáshoz még hiányzik a megfelelő tudományos háttér



GERON Corp./ California: (leállított klinikai kísérlet)
ES gerincvelő sérült betegek kezelésére

Advanced Cell Technology / Massachusetts : (Phase I.)
retina-pigmentsejtté-differenciáltatott ES használata
retina kóros elfajulásainak kezelésére (Macula dystrophya/fiatalkori
Macula degeneratio/öregkori)

Lancet 2012; 379: 713-20

Published **Online** January 23, 2012

Embryonic stem cell trials for macular degeneration:
a preliminary report

Steven D Schwartz, Jean-Pierre Hubschman, Gad Heilwell, Valentina Franco-Cardenas, Carolyn K Pan, Rosaleen M Ostrick, Edmund Mickunas, Roger Gay, Irina Klimanskaya, Robert Lanza

Feltételezett hatásmechanizmus:

- **differenciálódó sejtek beépülnek a sérült szövetbe**
- **Immunszupresszió**
- regenerációhoz szükséges **faktorok termelés**

Indukált Pluripotens Őssejtek felhasználhatósága:

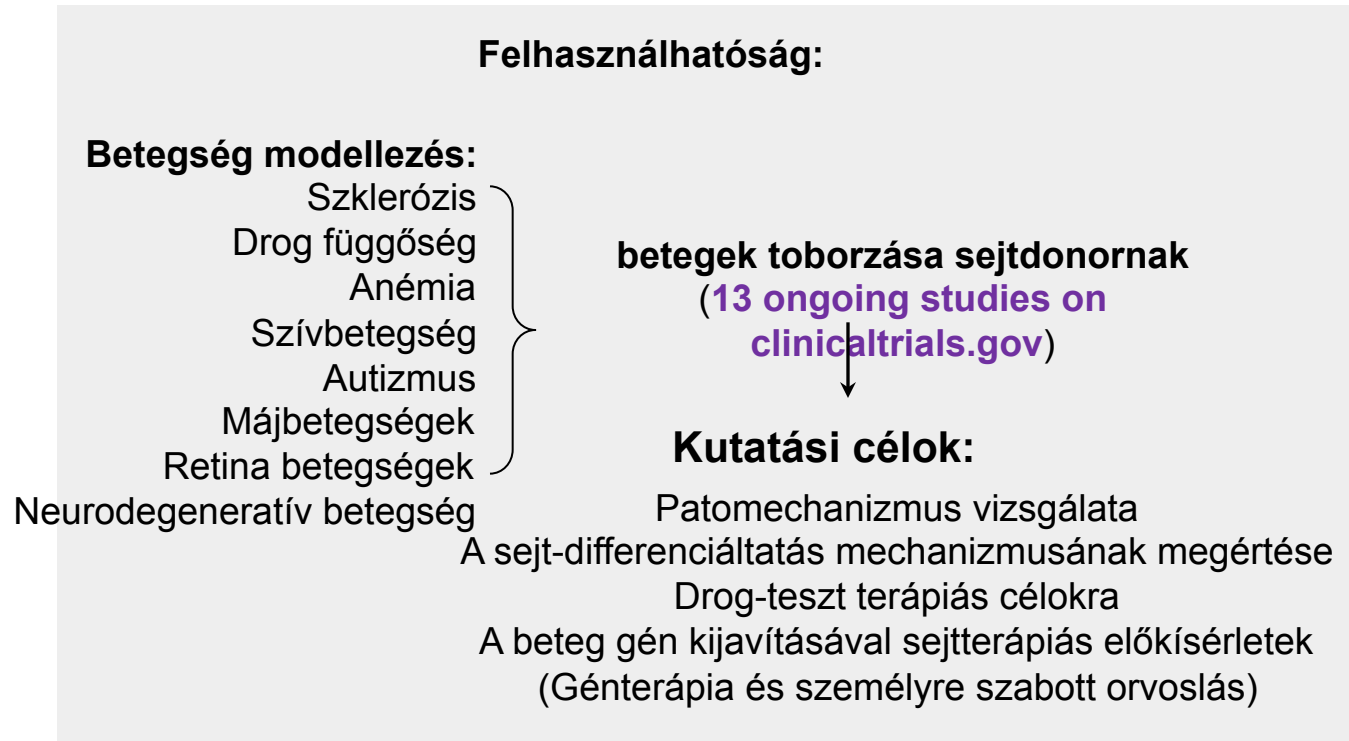
Fő-sejtforrás: fibroblasztok

(elméletben: minden sejtípus pl. vérből)

Előnyük: nagyfokú plaszticitás

könnyű hozzáférhetőség

etikailag nem kifogásolhatók



Feltételezett hatásmechanizmus:

- mint az ES sejtek: beépülhetnek a sérült szövetbe?

