



Inducirane pluripotentne matične celice in možnosti njihove uporabe pri zdravljenju dednih bolezni kože

Induced pluripotent stem cells and their potential for the development of therapeutic approaches for hereditary skin disorders

Tjaša Sorčan,¹ Bor Hrvatin Stančič,^{2,3} Špela Zemljič Jokhadar,⁴ Mirjana Liović³

Izvleček

Leta 1962 je Gurdon odkril, da je specializacija celic reverzibilna; jedro v jajčni celici žabe je nadomestil z jedrom iz črevesne celice. Iz spremenjene jajčne celice se je razvil paglavec. Leta 2006 je Yamanaka odkril, kako je mogoče z uporabo le nekaj genov reprogramirati odrasle mišje celice v stanje, ki je podobno embrionalnim celicam. Tako pridobljene celice so poimenovali inducirane pluripotentne matične celice, ki se lahko razvijejo v vse vrste celic v telesu, zato so obetavno orodje za različne pristope zdravljenja, ki temeljijo na celični terapiji. Gurdon in Yamanaka sta za odkritje, da je mogoče dozorele celice reprogramirati v pluripotentno stanje, leta 2012 prejela Nobelovo nagrado za fiziologijo. V tem prispevku bomo prikazali kratek pregled dognanj na tem področju, pri čemer bomo poudarili področje skupine redkih dednih bolezni krhkosti kože.

Abstract

In 1962, Gurdon discovered that cell specialization is reversible; he replaced the nucleus in a frog egg cell with a nucleus from an intestinal cell, and the altered egg cell developed into a tadpole. In 2006, Yamanaka discovered how by using just a few genes, adult mouse cells could be reprogrammed into a state similar to embryonic cells. The cells obtained in this way were called induced pluripotent stem cells, which can develop into all types of cells in the body, thus being a promising tool for various treatment approaches based on cell therapies. Gurdon and Yamanaka won the 2012 Nobel Prize in Physiology for discovering mature cells' potential to be reprogrammed into a pluripotent state. In this paper, we will briefly review findings in this field, emphasizing the group of rare hereditary diseases of skin fragility.

¹ Medicinski center za molekularno biologijo, Inštitut za biokemijo in molekularno genetiko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

² Dermatovenerološka klinika, Univerzitetni klinični center Ljubljana, Ljubljana, Slovenija

³ Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

⁴ Inštitut za biofiziko, Medicinska fakulteta, Univerza v Ljubljani, Ljubljana, Slovenija

Korespondenca / Correspondence: Mirjana Liović, e: mirjana.liovic@mf.uni-lj.si

Ključne besede: iPS celice; koža; celične terapije; bulozna epidermoliza

Key words: iPSC; skin; cell therapies; epidermolysis bullosa

Prispelo / Received: 21. 12. 2022 | **Sprejeto / Accepted:** 30. 5. 2023

Citirajte kot/Cite as: Sorčan T, Hrvatin Stančič B, Zemljič Jokhadar Š, Liović M. Inducirane pluripotentne matične celice in možnosti njihove uporabe pri zdravljenju dednih bolezni kože. Zdrav Vestn. 2023;92(9–10):427–34. DOI: <https://doi.org/10.6016/ZdravVestn.3410>

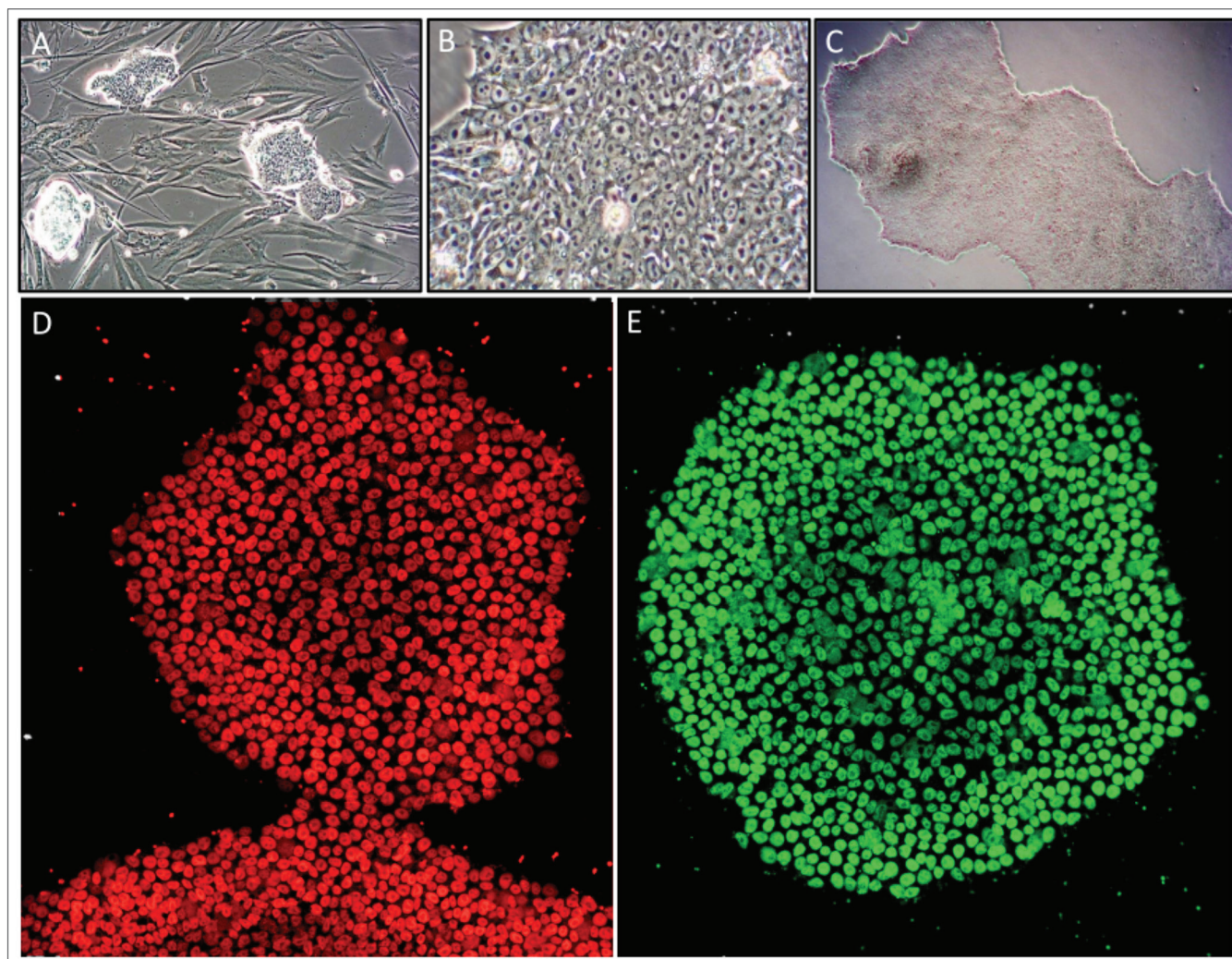


Avtorske pravice (c) 2023 Zdravniški Vestnik. To delo je licencirano pod Creative Commons Priznanje avtorstva-Nekomercialno 4.0 mednarodno licenco.

1 Uvod

Diferencirane somatske celice je možno dediferencirati v stanje, podobno pluripotentnosti oziroma totipotentnosti s prenosom jedrne vsebine somatskih celic v oocite (1) ali z zlitjem somatskih z embrionalnimi matičnimi celicami (*angl.* embryonal stem cells, ES-celice) (2,3). Takahashi in Yamanaka (4) sta leta 2006 uspešno inducirala stanje pluripotentnosti v mišjih odraslih fibroblastih, gojenih v kulturi, pri pogojih rasti za ES-celice z izražanjem le 4 rastnih faktorjev, in sicer: Oct3/4, Sox2, c-Myc in Klf4. Nastale celice so imenovali inducirane pluripotentne matične celice oz. iPS-celice

(*angl.* induced pluripotent stem cells). iPS-celice so kazale morfologijo in rastne lastnosti ES-celic, izražale pa so tudi tipične označevalce za ES-celice (Slika 1). Podkožna presaditev iPS-celic je v miškah sprožila nastanek tumorjev, ki so vsebovali celice različnih tkiv iz vseh treh zarodnih plasti (t.i. test teratoma). Po injiciranju mišjih iPS-celic v mišje blastociste so celice prispevale k razvoju mišjih zarodkov brez stranskih učinkov. Takahashi in sodelavci (5) so nato leta 2007 reprogramirali tudi humane dermalne fibroblaste. Nastale humane iPS-celice so bile prav tako podobne ES-celicam: izražale so rastne



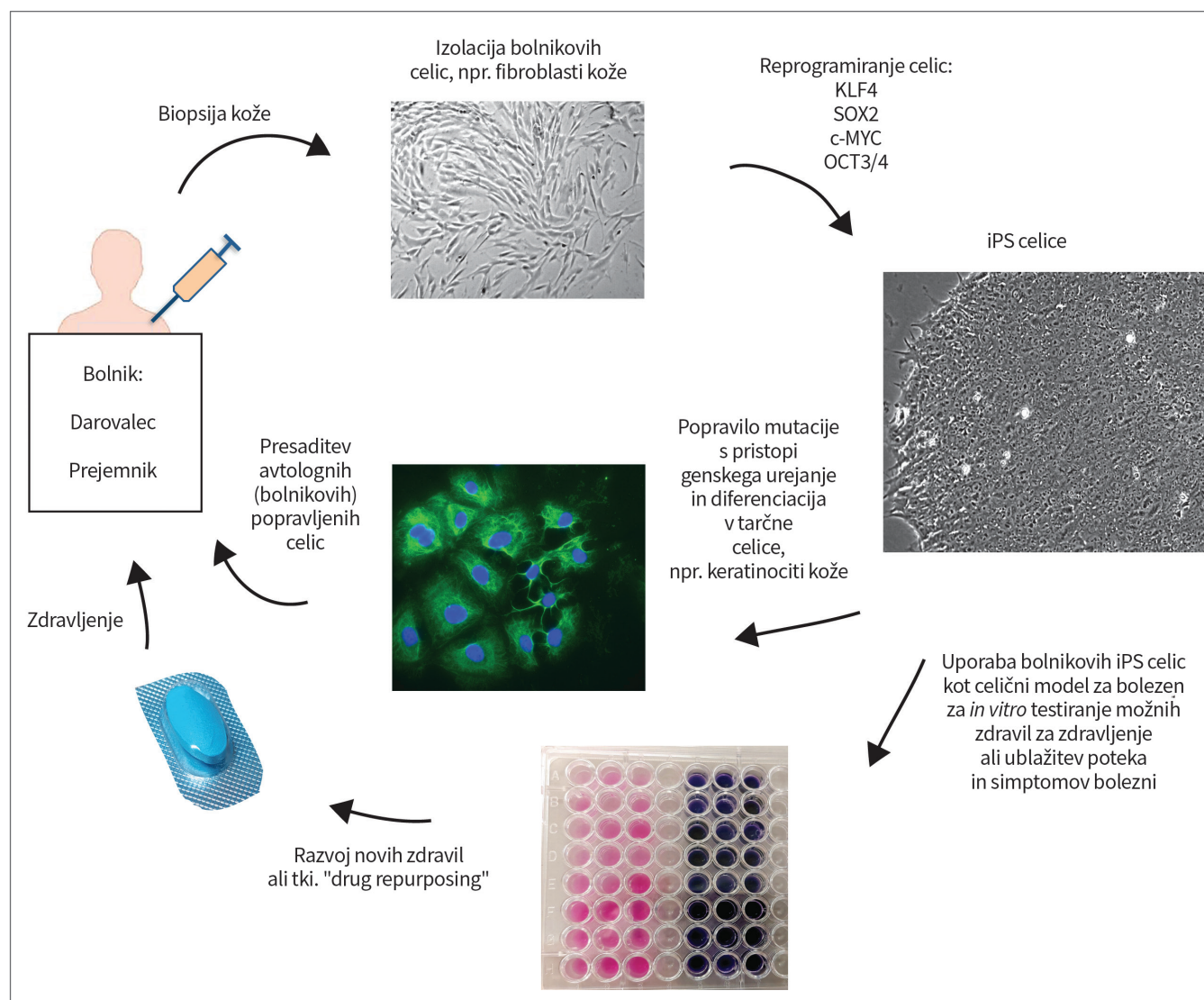
Slika 1: Morfologija in izražanje nekaterih rastnih faktorjev pri iPS-celicah.

(A) Vzpostavljanje iPS-celične linije s pomočjo fibroblastov kot t.i. "hranilnega sloja" (*angl.* feeder layer). Na sliki so vidni manjši otočki reprogramiranih celic, 10-kratna povečava. (B) Tipičen izgled iPS-celic, ki spominja na embrionalne celice. Celice so zelo majhne v primerjavi z odraslimi oz. diferencirane somatske celice, z velikimi jedri in tesno zbite, 40-kratna povečava. (C) Izgled večjega otočka iPS-celic pri 4-kratni povečavi. Celice rastejo tesno skupaj in so majhne. Zato se posamezne celice težko med seboj ločijo. (D) iPS-celice močno izražajo nekaj rastnih faktorjev, ki se izražajo v jedru in so značilni za embrionalne in pluripotentne matične celice, med katerimi sta tudi Nanog (D) in Oct (E).

faktorje ES ter se v laboratorijskih pogojih lahko razvile v celice vseh 3 zarodnih plasti.

Tehnologija pridobivanja iPS-celic omogoča nastanek celic, ki imajo nekatere lastnosti ES-celic, kot je pluripotentnost in, vsaj teoretično, neomejena proliferacija. Hkrati ni etičnih pomislekov glede njihove uporabe za pridobivanje odraslih celic in tkiv. Tako se je začelo obdobje razvoja iPS-celičnih linij iz različnih humanih somatskih tkiv/celic ne le v smislu razvoja novih modelnih sistemov za preučevanje bolezni, za množično testiranje aktivnih učinkov in za nova zdravila, temveč tudi kot osnova za razvoj pristopov za celične terapije (Slika 2). Pri slednjem je izjemnega pomena imunski odgovor in možnost zavrnitve presadka, ko gre za presaditev alogeno pridobljenih celic iz iPS-celičnih linij. Pri tem so najpomembnejši antigeni ABO, HLA razreda I (HLA-A, -B in -C) in II (HLA-DR, -DP in -DQ), manjši antigeni

histokompatibilnosti in dejavniki, kot je KIR oziroma imunoglobulinom podobni receptorji celic ubijalk (*angl.* natural killer cells, NK). Slednji so družina visoko polimorfnih receptorjev, ki uravnavajo delovanje človeških NK-celic. Ljudje nosimo podtipa HLA (par), katerih izražanje je odvisno od etnične pripadnosti in geografskega porekla posameznika. Da bi preprečili zavrnitev presadka, je potrebna sistemska imunosupresija z zdravili, kar vključuje resna dodatna tveganja za zdravje bolnikov. Zato je za uvajanje tovrstnih iPS-celičnih terapij pomembna selekcija darovalcev tkiv za pripravo iPS-celic, ki so homozigotni za HLA haplotipe. S tem omogočijo ujemanje označevalcev HLA bolnikov, ki so heterozigoti za te haplotipe. Pred leti so izračunali, da bi npr. v ZDA 100 haplotipsko homozigotnih iPS-celičnih linij omogočalo visoko stopnjo ujemanja tkiv za potrebe alogeničnih celičnih terapij pri 78 % evropskih Američanov, 63 %



Slika 2: Priprava avtolognih iPS-celic in možna uporaba za avtologno celično terapijo in iskanje novih zdravil.

azijskih Američanov in 45 % Afroameričanov (6).

Pred 10 leti so predlagali ustanovitev mednarodne mreže iPS-celičnih bank, skladno z GMP pogoji dela, v katerih bodo hranili celične linije, homozigotne za običajne haplotipe HLA (7). Na svetovni ravni bi s tem dobili t.i. »haploknjižnico« linij iPS-celic, ki bi omogočala največjo možno pokritost svetovnega prebivalstva za celične terapije. Global Alliance for iPSC Therapies (GaiT, <http://www.gait.global>) je neprofitna svetovna organizacija, v kateri sodelujejo tako različne zdravstvene in raziskovalne ustanove kot tudi podjetja. Njen namen je omogočiti razvoj in dostop do kliničnih in haplotipiziranih iPS-celic za razvoj celičnih terapij. Leta 2020 je mreža GAIT imela že 500 članov iz 17 držav. Na ravni EU je pravkar začela delovati tudi akcija COST HAPLO-iPS, katere člani smo (<https://www.cost.eu/actions/CA21151/> – Generation of human induced pluripotent stem cells from HAPLO-selected cord blood samples). Namen je ustanovitev celične banke darovalcev najbolj pogostih HLA haplotipov, s katerimi bi lahko pokrivali potrebe čim večjega dela evropske populacije za celične terapije. Nato bi pripravili kliničnim aplikacijam namenjene povsem okarakterizirane celice iPS iz homozigotnih donorjev HLA. Mreža bi obenem skrbela za standardizacijo postopkov pridobivanja osnovnega materiala (tkiv), postopkov priprave, karakterizacije ter hranjenja iPS-celic in za potrebno infrastrukturo. Med cilji je tudi poenotenje obstoječega znanja na ravni EU oziroma izenačenje na isto raven. Kratkoročni cilj je, da se v naslednjih 2 letih pripravi pregled možnih produktov, ki bi jih lahko razvili do predklinične ravni. V možne ciljne skupine so bili opredeljeni predvsem bolniki z rakom (T-celice, NK-celice in makrofage, ki so pridobljene iz iPS-celic iz banke celic HAPLO-iPS) ter tudi možne aplikacije v regenerativni medicini, pri presaditvi organov in pri avtoimunskih boleznih. Uredili bodo tudi register tako pripravljenih iPS-celic in njihovih derivatov. Sicer v evropskem okolju že obstaja register iPS-celic (<https://hpscereg.eu/>), ki so jih pridobili iz različnih tkiv oziroma diferenciranih celic, pri čemer so upoštevali določene standarde priprave in karakterizacije. Žal zaenkrat te celice niso namenjene terapevtskim namenom, vendar bi se v prihodnosti lahko našel klinični namen tudi za nekatere od njih. Pri uporabi alogeni iPS-celic in njihovih derivatov se je v zadnjih letih pojavila kot možnost genetske manipulacije genov HLA in znižanje ali popolno utišanje izražanja proteinov HLA, ki s tem ne bi aktivirali imunskega odziva v prejemniku – pri bolniku. Doslej so to s pristopi RNA interference in CrisprCas9 genskega preurejanja eksperimentalno dosegli tako pri različnih tipih primarnih celic kot tudi pri iPS-celicah in embrionalnih celicah (8-10).

Po drugi plati je avtologne iPS celice teoretično možno pripraviti iz celic vsakega bolnika. Avtologni vir zagotavlja, da bi terapije bile naravnane na vsakega bolnika posebej in brez potrebe po imunosupresiji. Kljub temu so se pojavili tudi primeri, ko so avtologni presadki izzvali imunski odgovor zaradi epigenetskih sprememb, somatskih mutacij ali zaradi genetske nestabilnosti iPS-celic na splošno (11-13). Slaba plat avtolognih terapij so predvsem visoki stroški ter čas, ki je potreben za njihovo pripravo. Doslej so pri človeku opravili le 3 študije, ki so zajemale presaditev avtolognih somatskih celic, pridobljenih iz iPS-celic: pri zdravljenju degenerativnih procesov očesne makule (s pridobljenimi celicami iPS mrežničnega pigmentnega epitela), zdravljenju Parkinsonove bolezni (z iPS pridobljenimi dopaminergičnimi nevroni) in zdravljenju trombocitopenije (z iPS pridobljenimi trombociti). V slednji 1 leto po presaditvi niso ugotovili stranskih učinkov (japonski register kliničnih študij JRCTa050190117), medtem ko v drugih dveh primerih niso zasledili stranskih učinkov tudi 4 leta po presaditvi (14-16). Veliko več kliničnih poskusov poteka/je potekalo z iPS celicami iz alogeni virov, okoli 15 (17).

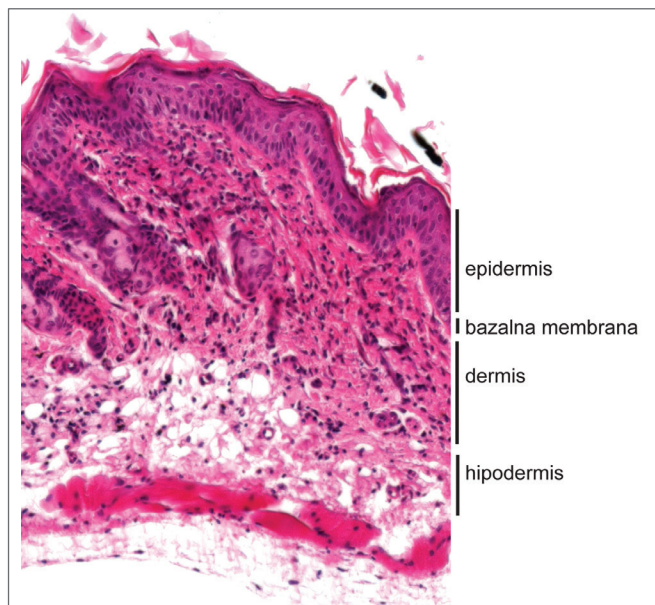
2 Koža

Terapije z iPS-celicami so zaradi dostopnosti kože zelo obetavne na področju genodermatoz tako za odvzem materiala bolnikov kot tudi za presaditev oziroma aplikiranje možnih terapij. Koža je največji organ človeškega telesa, ki prekriva okoli 2 m² površine in pri povprečni telesni masi zajema 6–8 kg. Njena glavna naloga je zaščita pred zunanjimi vplivi, kot so patogeni, UV sevanje, mehanske poškodbe in kemijski vplivi. iPS-celice imajo velik potencial tako za razvoj celičnih in tkivnih modelov bolezni kot tudi kot izvor keratinocitov in drugih kožnih celic. To je še posebej pomembno, ker je celični material bolnikov omejen.

Širok obseg uporabnosti celičnih terapij v dermatologiji je posledica zgradbe kože ter funkcije celic in proteinov, ki pri tem sodelujejo. Koža je sestavljena iz 3 plasti. Spodnjo plast imenujemo hipodermis oz. podkožje, sledi ji dermis oz. usnjica, zgornjo plast, ki je neposredno izpostavljena zunanjemu okolju in njegovim vplivom, imenujemo epidermis oz. povrhnjica (Slika 3).

Hipodermis je najgloblja plast kože, sestavljena iz vezivnega in maščobnega tkiva. Njegova glavna naloga je toplotna izolacija telesa in shranjevanje energije ter varovanje organov, kosti in mišic pred poškodbami.

Dermis je vezivno tkivo, ki je prepleteno s številnimi živci in žilami ter kožnimi priveski. Nudi strukturno in prehransko podporo koži, saj jo oskrbuje s kisikom in



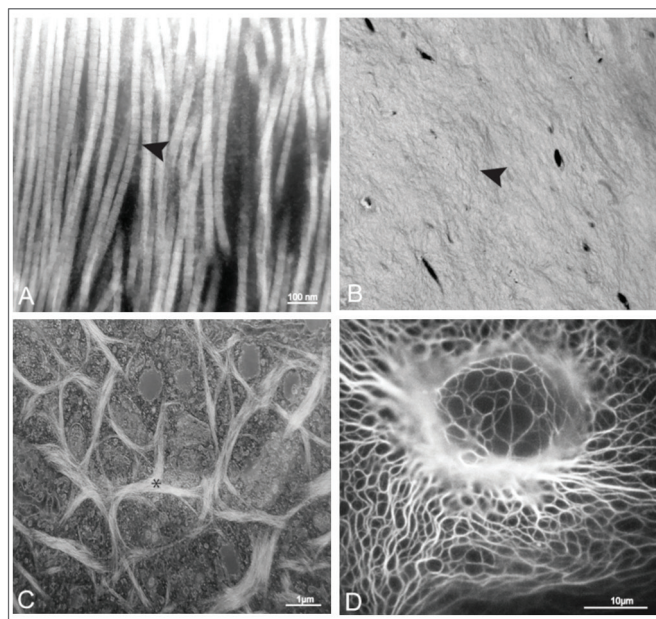
Slika 3: Histologija kože.

Debelina epidermisa, dermisa in hipodermisa se razlikuje glede na dele telesa, na katerem se nahaja; npr. na podplatih in dlaneh je zadebeljena, medtem ko je na obrazu tanka.

hranilnimi snovmi ter odreja odpadne snovi. Razdeljen je na papilarni (zgornji) in retikularni (spodnji) dermis. Glavna sestavina dermisa je zunajcelični matriks, ki vsebuje pretežno kolagenska in elastinska vlakna. V človeškem telesu je 28 različnih tipov kolagenov. Kolagenska vlakna imajo izredno kompleksno strukturo. V osnovi gre za dozorevanje osnovne molekule proteina kolagena, ki tvori superheliks na strukturo iz treh α -verig. Vsaka veriga vsebuje 1.400 aminokislin, vsak zavoj pa vsebuje le 3 aminokisljine. Nastajanje superheliksa omogoča ponovitev 3 aminokislin: Gly-X-Pro ali Gly-X-Hyp, od katerih je hidroksi prolin (Hyp) zelo pomembna aminokisljina, ki nastane s hidroksilacijo prolina. Za to je potreben vitamin C, ki deluje kot reducent za encim prolin hidroksilazo. Pomankanje vitamina C povzroča skorbut, ki povzroči krvavenje dlesni, izpadanje zob, degeneracijo kosti in slabo celjenje ran. Verige kolagena v superheliksu so zelo tesno ovite druga okoli druge, kar omogoča majhna aminokisljina glicin. Tako nastane t.i. tropokolagen, ki se nato povezuje z drugimi molekulami tropokolagena. Za nastanek posameznega kolagenskega vlakna oziroma fibrile jih je potrebnih do 1.000 (Slika 4, A in B). Kolagen zajema skoraj četrtino vseh proteinov v telesu. Kolagene najdemo v vseh človeških tkivih, še posebej v kitah in koži. Odgovoren je za zagotavljanje oblike in opore kože. Kolagena tipa I in III sta v največji meri prisotna v dermisu odraslih. Papilarni dermis vsebuje predvsem kolagen tipa III, ki je razporejen v tanka, slabo organizirana vlakna, medtem ko retikularni dermis vsebuje predvsem kolagen tipa I, ki je

razporejen v velika, debela in dobro organizirana vlakna. Dermis vsebuje štiri glavne vrste celic: fibroblaste, dermalne dendritične celice, makrofage in mastocite. Fibroblasti so metabolno zelo aktivne celice, ki skrbijo za vzdrževanje in preoblikovanje vezivnega tkiva tako, da sintetizirajo kolagen in komponente zunajceličnega matriksa. Dermalne dendritične celice in makrofagi igrajo pomembno vlogo pri prirojeni in pridobljeni imunosti, mastociti pa pri sprožitvi imunskega in vnetnega odziva. Vse 3 vrste celic izvirajo iz kostnega mozga. Poleg njih najdemo v dermisu tudi krvne in limfne žile, živčne končiče, čutilna telesca in lasne korenine ter žleze lojnice in znojnice (18).

Epidermis je zgornja, večslojna plast celic kože, ki jo večinoma sestavljajo celice keratinociti, ki so izredno bogati s strukturnim proteinom keratinom. Keratini so kompleksni polimerni proteini, ki se tkivno in celično specifično izražajo v različnih tkivih. Epidermalnih keratinov je več kot 40. Keratine po aminokislinskem zaporedju in strukturi uvrščamo v veliko družino proteinov, ki tvorijo intermediarne filamente (IF) celičnega citoskeleta. Ti so razdeljeni v 2 od 6 skupin proteinov IF, v tip I, t.i. kisli keratini, in v tip II, t.i. bazični keratini. Za razliko od ostalih proteinov IF so keratini obvezni heterodimeri določenega keratina tipa I z določenim keratinom tipa II. Heterodimeri se nato združujejo v kompleksnem zaporedju in gradijo posamezne keratinske filamente, debeline okoli 10 nm, ki lahko vsebujejo tudi do 40.000 dimernih podenot. Keratinski citoskelet je precej razvejan in spominja na mrežo (Slika 4, C in D). Keratini zagotavljajo ne le mehansko odpornost, temveč so vključeni tudi v številne funkcije celic in tkiv, kot so rast celic, proliferacija, celjenje ran itd. (19). Približno 800 mutacij, ki prizadenejo keratinske gene, je doslej že bilo povezanih z različnimi keratinopatijami oziroma redkimi dednimi boleznimi krhkosti celic (20). V to skupino se uvrščajo tudi številne dedne bolezni krhkosti kože, patološke spremembe nohtov in las, distrofija roženice pa tudi možne patologije, kot so kronično vnetje čreves, različne bolezni jeter, ciroza jeter, pankreatitis itd. (21). V različnih slojih epidermisa se izražajo različni keratini in epidermalni proteini (keratini 5, 14, 1, 10, 9, 2e, filagrin, involucrin, lorikrin, transglutaminaze). Keratinociti v najnižji plasti epidermisa, v bazalnem sloju, se delijo in razvijajo oziroma diferencirajo s procesom terminalne diferenciacije. Pri tem se premikajo navzgor do najvišjega oziroma mrtvega in poroženega sloja ploščatih ostankov keratinocitov, ki je v neposrednem stiku z zunanjim svetom in se nenehno lušči in nadomešča. Med procesom terminalne diferenciacije keratinociti spreminjajo obliko in izražanje strukturnih proteinov ter na koncu odmrejo. Za obnovo epidermisa so potrebni približno 4 tedni. Pri tem igrajo pomembno vlogo različice proteina p63, člana



Slika 4: Najbolj pogosti strukturni proteini kože.

(A) Struktura posameznih kolagenskih vlaken po negativnem senčenju na transmisijem elektronskem mikroskopu (TEM), 60.000-kratna povečava. Vidne so tipične in ponavljajoče se temnejše proge (glej puščico), ki nastanejo zaradi tesnega pakiranja posameznih kolagenskih fibril. (B) Kolagenska vlakna v tkivu, histološki preparat (puščica), 16-kratna povečava. (C) Izgled keratinskega intermediarnega citoskeleta keratinocitov na TEM pri negativnem senčenju (številne vidne svetle proge, ki se povezujejo druga na drugo, glej asterisk), pri 30.000-kratni povečavi. (D) Pod UV svetlobo (keratin 14 je označen s fluorokromom), kjer kaže izredno mrežasto strukturo (100-kratna povečava).

družine transkripcijskih dejavnikov p53 (22). V epidermisu najdemo tudi Merkllove in Langerhansove celice ter melanocyte. Slednji so specializirane dendritične celice, ki proizvajajo melaninske pigmentne granule. Merkllove celice so mehanoreceptorji, medtem ko so Langerhansove celice epidermalne dendritične celice, ki so del adaptivnega imunskega odziva (23). Epidermis (bazalni sloj) in dermis sta fizično povezana preko bazalne membrane, ki je kompleks številnih strukturnih proteinov, kot so kolagen 7, kolagen 17, integrina $\alpha 6$ in $\beta 4$ ter laminin.

3 Dedna bulozna epidermoliza in razvoj celičnih terapij

Enako kot pri keratinih tudi mutacije v proteinih bazalne membrane povzročajo različne bolezni krhkosti kože, med katerimi se daleč najbolj preučuje dedna bulozna epidermoliza (BE). BE je skupina redkih genetsko heterogenih kožnih bolezni, za katere je značilna krhkost kože, mehurji in poškodbe na sluznicah. Mutacije

najdemo na kar 21 različnih genih, ki kodirajo zunajcelične in znotrajcelične proteine, ki se izražajo v epidermisu, dermalno-epidermalnem stiku (DEJ) in dermisu (24). BE razdelimo v različne podtippe glede na raven nastajanja mehurjev oziroma bullae, v BE simpleks (vezana je predvsem na mutacije v keratinih 5 in 14), junkcijsko BE (povezana je z mutacijami laminina (proteina zunajceličnega matriksa (ECM)) ali strukturnih komponent hemidesmosomov (HD), tj. integrinskih podenot ($\alpha 6$ ali $\beta 4$) ali kolagena XVII (180-kDa bulozni pemfigoidni antigen, BP180), distrofično BE (vezana je na mutacije v kolagenu VII) in Kindlerjev sindrom (povzročajo ga mutacije kindlina 1, ki je del celičnih struktur, imenovanih fokalne adhezije (FA)) (25). Standardna terapija za BE je uporaba ustreznih sodobnih oblog za rane ali v redkih primerih presaditev kože v predelih razjed, redno spremljanje in preprečevanje možnih zapletov ter pogoste kontrole za zgodnje odkrivanje kožnega raka. Bolniki z BE imajo skrajšano življenjsko dobo in zmanjšano kakovost življenja, resnost je odvisna od kliničnih in genetskih podtipov. Kljub velikemu napredku na področju zdravljenja BE uspešne terapije še ni na voljo. Tehnologija iPS-celic je zanimiv vir možnih celičnih terapij tovrstnih genodermatoz, saj je iPS-celice možno pripraviti iz fibroblastov ali keratinocitov pacientov, izoliranih iz biopsije kože (26-29). iPS-celice, pridobljene iz celic bolnikov, je nato treba še gensko popraviti, diferencirati v želeno vrsto celic in presaditi istemu darovalcu kot avtotransplantat.

Posledica ponavljajočih se mehurjev – bullae, ki vključujejo kožo, sluznice in prebavila in se pogosto celijo z brazgotinami, je visoka smrtnost v mladosti, predvsem zaradi agresivnega metastatskega ploščatoceličnega karcinoma. Zaradi teh zapletov, ki imajo znaten družbeno-ekonomski vpliv, se velik del raziskav usmerja predvsem v recesivno distrofično bulozno epidermolizo (RDBE). Vzrok za RDBE so mutacije v genu COL7A1 oz. beljakovini tipa VII kolagena (C7), ki jo običajno proizvajajo keratinociti in v manjši meri fibroblasti. Igra pomembno vlogo v fibrilnem sidrnem kompleksu (*angl.* anchoring fibrils) v bazalni membrani.

Razvoj orodij za urejanje genov (*angl.* gene editing) in njihova uporaba pri bolniku avtolognih iPS-celicah sta pokazala obetavne rezultate. Gensko urejanje je omogočilo natančnejšo korekcijo mutacij pri bolnikih z EB. Izvedljivost so dokazali z uporabo inženiranih nukleaz, kot so meganukleaze, cinkovi prsti (ZFN), TALEN in nazadnje s tehnologijo CRISPR/Cas9, ki je izboljšala hitrost in učinkovitost pri popravilu mutacij v keratinocitih in fibroblastih za RDBE (30-34). V teh pristopih gre za popravilo genetskega zapisa, ki temelji na dvojnoverižni

prekinitvi DNK, kar je lahko hkrati tudi tvegano. Nedavno so razvili tudi pristope urejanja posameznih nukleinskih baz (*angl.* base editing), ki omogočajo spremembo C v T (CBE) ali A v G (AGE), saj je velika večina mutacij vezana na posamezne spremembe nukleotidov v DNK. Urejanje baz zaenkrat kaže izjemno stopnjo uspešnosti in odsotnost možnih neželenih zapletov, ki nastanejo pri dvojnoverižnih prekinitvah genskega urejanja (35-37). Uporabo tega pristopa za RDEB so testirali na primarnih fibroblastih in iPS-celicah (38). Veliko naporov se usmerja tudi v protokole diferenciacije iPS-celic v keratinocite in fibroblaste, ki bi bili nato primerni za zdravljenje BE (39-41). Keratinociti, ki so jih zaenkrat pridobili iz iPS-celic, imajo podobne morfološke in biološke lastnosti kot primarne celice ter tvorijo epidermalne plahte celic, ki izražajo kolagen 7 (33,42). Gensko popravljeni keratinociti, pridobljeni z diferenciacijo JBE in RDEB iPS-celic, lahko tvorijo tudi 3D ekvivalente kože (26,40,43-45). V zadnjem času so iPS-celice pripravili tudi iz T-celic bolnikov z RDEB (46), iz bolnikov z bulozno epidermolizo simpleks (28) ter iz zdrave osebe z največjim možnim številom ponovitev za gen filagrin, kar je idealna

kontrolna celična linija za študije kožne pregrade (47).

4 Zaključek

Metodologija uporabe iPS-celic je kot osnova za rutinsko zdravljenje redkih bolezni zaradi genomske nestabilnosti samih iPS-celic in možnega spontanega razvoja teratomov še vedno vprašljiva (48,49). V povezavi s pristopi genetskega urejanja se odpirajo možnosti za nastanek dodatnih nezaželenih sprememb. Keratinociti, pridobljeni iz iPS-celic, npr. hitro dosežejo stanje senescence, kar pomeni, da bi bilo treba selekcionirati celice, ki so po genetskem statusu ustrezne za nadaljnje namnoževanje in zdravljenje. Vse našteje ovire predstavljajo velik izziv za naslednjo stopnjo razvoja pristopov celične terapije, ki temeljijo na iPS-celicah. Vsekakor pa te težave niso nerešljive. Je le vprašanje časa, kdaj bodo tovrstne terapije postale rutinske.

Izjava o navzkrižju interesov

Avtorji nimamo navzkrižja interesov.

Literatura

- Wilmot I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KH. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997;385(6619):810-3. DOI: [10.1038/385810a0](https://doi.org/10.1038/385810a0) PMID: 9039911
- Cowan CA, Atienza J, Melton DA, Eggan K. Nuclear reprogramming of somatic cells after fusion with human embryonic stem cells. *Science*. 2005;309(5739):1369-73. DOI: [10.1126/science.1116447](https://doi.org/10.1126/science.1116447) PMID: 16123299
- Tada M, Takahama Y, Abe K, Nakatsuji N, Tada T. Nuclear reprogramming of somatic cells by in vitro hybridization with ES cells. *Curr Biol*. 2001;11(19):1553-8. DOI: [10.1016/S0960-9822\(01\)00459-6](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(01)00459-6) PMID: 11591326
- Takahashi K, Yamanaka S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*. 2006;126(4):663-76. DOI: [10.1016/j.cell.2006.07.024](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024) PMID: 16904174
- Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, et al. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell*. 2007;131(5):861-72. DOI: [10.1016/j.cell.2007.11.019](https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.019) PMID: 18035408
- Gourraud PA, Gilson L, Girard M, Peschanski M. The role of human leukocyte antigen matching in the development of multiethnic "haplobank" of induced pluripotent stem cell lines. *Stem Cells*. 2012;30(2):180-6. DOI: [10.1002/stem.772](https://doi.org/10.1002/stem.772) PMID: 22045598
- Turner M, Leslie S, Martin NG, Peschanski M, Rao M, Taylor CJ, et al. Toward the development of a global induced pluripotent stem cell library. *Cell Stem Cell*. 2013;13(4):382-4. DOI: [10.1016/j.stem.2013.08.003](https://doi.org/10.1016/j.stem.2013.08.003) PMID: 24094319
- Börger AK, Eicke D, Wolf C, Gras C, Aufderbeck S, Schulze K, et al. Generation of HLA-Universal iPSC-Derived Megakaryocytes and Platelets for Survival Under Refractoriness Conditions. *Mol Med*. 2016;22(1):274-85. DOI: [10.2119/molmed.2015.00235](https://doi.org/10.2119/molmed.2015.00235) PMID: 27262025
- Deuse T, Seifert M, Tyan D, Tsao PS, Hua X, Velden J, et al. Immunobiology of naïve and genetically modified HLA-class-I-knockdown human embryonic stem cells. *J Cell Sci*. 2011;124(Pt 17):3029-37. DOI: [10.1242/jcs.087718](https://doi.org/10.1242/jcs.087718) PMID: 21878509
- Figueiredo C, Oldhafer F, Wittauer EM, Carvalho-Oliveira M, Akhdar A, Beetz O, et al. Silencing of HLA class I on primary human hepatocytes as a novel strategy for reduction in alloreactivity. *J Cell Mol Med*. 2019;23(8):5705-14. DOI: [10.1111/jcmm.14484](https://doi.org/10.1111/jcmm.14484) PMID: 31180181
- Araki R, Uda M, Hoki Y, Sunayama M, Nakamura M, Ando S, et al. Negligible immunogenicity of terminally differentiated cells derived from induced pluripotent or embryonic stem cells. *Nature*. 2013;494(7435):100-4. DOI: [10.1038/nature11807](https://doi.org/10.1038/nature11807) PMID: 23302801
- Todorova D, Kim J, Hamzeinejad S, He J, Xu Y. Brief Report: Immune Microenvironment Determines the Immunogenicity of Induced Pluripotent Stem Cell Derivatives. *Stem Cells*. 2016;34(2):510-5. DOI: [10.1002/stem.2227](https://doi.org/10.1002/stem.2227) PMID: 26439188
- Deuse T, Hu X, Agbor-Enoh S, Koch M, Spitzer MH, Gravina A, et al. De novo mutations in mitochondrial DNA of iPSCs produce immunogenic neoepitopes in mice and humans. *Nat Biotechnol*. 2019;37(10):1137-44. DOI: [10.1038/s41587-019-0227-7](https://doi.org/10.1038/s41587-019-0227-7) PMID: 31427818
- Mandai M, Watanabe A, Kurimoto Y, Hiram Y, Morinaga C, Daimon T, et al. Autologous Induced Stem-Cell-Derived Retinal Cells for Macular Degeneration. *N Engl J Med*. 2017;376(11):1038-46. DOI: [10.1056/NEJMoa1608368](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1608368) PMID: 28296613
- Schweitzer JS, Song B, Herrington TM, Park TY, Lee N, Ko S, et al. Personalized iPSC-Derived Dopamine Progenitor Cells for Parkinson's Disease. *N Engl J Med*. 2020;382(20):1926-32. DOI: [10.1056/NEJMoa1915872](https://doi.org/10.1056/NEJMoa1915872) PMID: 32402162
- Takagi S, Mandai M, Gocho K, Hiram Y, Yamamoto M, Fujihara M, et al. Evaluation of Transplanted Autologous Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Retinal Pigment Epithelium in Exudative Age-Related Macular Degeneration. *Ophthalmol Retina*. 2019;3(10):850-9. DOI: [10.1016/j.oret.2019.04.021](https://doi.org/10.1016/j.oret.2019.04.021) PMID: 31248784
- Flahou C, Morishima T, Takizawa H, Sugimoto N. Fit-For-All iPSC-Derived Cell Therapies and Their Evaluation in Humanized Mice With NK Cell Immunity. *Front Immunol*. 2021;12:662360. DOI: [10.3389/fimmu.2021.662360](https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.662360) PMID: 33897711

18. Kretzschmar K, Watt FM. Markers of epidermal stem cell subpopulations in adult mammalian skin. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2014;4(10):a013631. DOI: [10.1101/cshperspect.a013631](https://doi.org/10.1101/cshperspect.a013631) PMID: 24993676
19. Alam H, Sehgal L, Kundu ST, Dalal SN, Vaidya MM. Novel function of keratins 5 and 14 in proliferation and differentiation of stratified epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 2011;22(21):4068-78. DOI: [10.1091/mbc.e10-08-0703](https://doi.org/10.1091/mbc.e10-08-0703) PMID: 21900500
20. Chamcheu JC, Siddiqui IA, Syed DN, Adhami VM, Liovic M, Mukhtar H. Keratin gene mutations in disorders of human skin and its appendages. *Arch Biochem Biophys*. 2011;508(2):123-37. DOI: [10.1016/j.abb.2010.12.019](https://doi.org/10.1016/j.abb.2010.12.019) PMID: 21176769
21. Toivola DM, Boor P, Alam C, Strnad P. Keratins in health and disease. *Curr Opin Cell Biol*. 2015;32:73-81. DOI: [10.1016/j.ceb.2014.12.008](https://doi.org/10.1016/j.ceb.2014.12.008) PMID: 25599598
22. Hu MS, Borrelli MR, Hong WX, Malhotra S, Cheung AT, Ransom RC, et al. Embryonic skin development and repair. *Organogenesis*. 2018;14(1):46-63. DOI: [10.1080/15476278.2017.1421882](https://doi.org/10.1080/15476278.2017.1421882) PMID: 29420124
23. Fuchs E. Scratching the surface of skin development. *Nature*. 2007;445(7130):834-42. DOI: [10.1038/nature05659](https://doi.org/10.1038/nature05659) PMID: 17314969
24. Has C, Liu L, Bolling MC, Charlesworth AV, El Hachem M, Escámez MJ, et al. Clinical practice guidelines for laboratory diagnosis of epidermolysis bullosa. *Br J Dermatol*. 2020;182(3):574-92. DOI: [10.1111/bjd.18128](https://doi.org/10.1111/bjd.18128) PMID: 31090061
25. Fine JD, Johnson LB, Weiner M, Suchindran C. Cause-specific risks of childhood death in inherited epidermolysis bullosa. *J Pediatr*. 2008;152(2):276-80. DOI: [10.1016/j.jpeds.2007.06.039](https://doi.org/10.1016/j.jpeds.2007.06.039) PMID: 18206702
26. Tolar J, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide CR, McElmurry RT, et al. Induced pluripotent stem cells from individuals with recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2011;131(4):848-56. DOI: [10.1038/jid.2010.346](https://doi.org/10.1038/jid.2010.346) PMID: 21124339
27. Matsumura W, Fujita Y, Nakayama C, Shinkuma S, Suzuki S, Nomura T, et al. Establishment of integration-free induced pluripotent stem cells from human recessive dystrophic epidermolysis bullosa keratinocytes. *J Dermatol Sci*. 2018;89(3):263-71. DOI: [10.1016/j.jdermsci.2017.11.017](https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2017.11.017) PMID: 29229433
28. Kolundzic N, Khurana P, Hobbs C, Rogar M, Ropret S, Törmä H, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC) line from an epidermolysis bullosa simplex patient heterozygous for keratin 5 E475G mutation and with the Dowling Meara phenotype. *Stem Cell Res (Amst)*. 2019;37:101424. DOI: [10.1016/j.scr.2019.101424](https://doi.org/10.1016/j.scr.2019.101424) PMID: 30933721
29. Ropret S, Jeriha J, Sorčan T, Rogar M, Zemljčič Jokhadar Š, McGrath JA, et al. Induced pluripotent stem cell (iPSC) line MLI-004A derived from a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB). *Stem Cell Res (Amst)*. 2021;55:102463. DOI: [10.1016/j.scr.2021.102463](https://doi.org/10.1016/j.scr.2021.102463) PMID: 34284275
30. Osborn MJ, Starker CG, McElroy AN, Webber BR, Riddle MJ, Xia L, et al. TALEN-based gene correction for epidermolysis bullosa. *Mol Ther*. 2013;21(6):1151-9. DOI: [10.1038/mt.2013.56](https://doi.org/10.1038/mt.2013.56) PMID: 23546300
31. Webber BR, Osborn MJ, McElroy AN, Twaroski K, Lonetree CL, DeFeo AP, et al. CRISPR/Cas9-based genetic correction for recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *NPJ Regen Med*. 2016;1(1):16014. DOI: [10.1038/npjregenmed.2016.14](https://doi.org/10.1038/npjregenmed.2016.14) PMID: 28250968
32. Sebastiano V, Zhen HH, Haddad B, Bashkirova E, Melo SP, Wang P, et al. Human COL7A1-corrected induced pluripotent stem cells for the treatment of recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med*. 2014;6(264). DOI: [10.1126/scitranslmed.3009540](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009540) PMID: 25429056
33. Jackóv J, Guo Z, Hansen C, Abaci HE, Doucet YS, Shin JU, et al. CRISPR/Cas9-based targeted genome editing for correction of recessive dystrophic epidermolysis bullosa using iPSCs. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2019;116(52):26846-52. DOI: [10.1073/pnas.1907081116](https://doi.org/10.1073/pnas.1907081116) PMID: 31818947
34. Itoh M, Kawagoe S, Tamai K, Nakagawa H, Asahina A, Okano HJ. Footprint-free gene mutation correction in induced pluripotent stem cell (iPSC) derived from recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) using the CRISPR/Cas9 and piggyBac transposon system. *J Dermatol Sci*. 2020;98(3):163-72. DOI: [10.1016/j.jdermsci.2020.04.004](https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2020.04.004) PMID: 32376152
35. Komor AC, Kim YB, Packer MS, Zuris JA, Liu DR. Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage. *Nature*. 2016;533(7603):420-4. DOI: [10.1038/nature17946](https://doi.org/10.1038/nature17946) PMID: 27096365
36. Komor AC, Badran AH, Liu DR. CRISPR-Based Technologies for the Manipulation of Eukaryotic Genomes. *Cell*. 2017;168(1-2):20-36. DOI: [10.1016/j.cell.2016.10.044](https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.10.044) PMID: 27866654
37. Gaudelli NM, Komor AC, Rees HA, Packer MS, Badran AH, Bryson DI, et al. Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage. *Nature*. 2017;551(7681):464-71. DOI: [10.1038/nature24644](https://doi.org/10.1038/nature24644) PMID: 29160308
38. Osborn MJ, Newby GA, McElroy AN, Knipping F, Nielsen SC, Riddle MJ, et al. Base Editor Correction of COL7A1 in Recessive Dystrophic Epidermolysis Bullosa Patient-Derived Fibroblasts and iPSCs. *J Invest Dermatol*. 2020;140(2):338-347.e5. DOI: [10.1016/j.jid.2019.07.701](https://doi.org/10.1016/j.jid.2019.07.701) PMID: 31437443
39. Bilousova G, Chen J, Roop DR. Differentiation of mouse induced pluripotent stem cells into a multipotent keratinocyte lineage. *J Invest Dermatol*. 2011;131(4):857-64. DOI: [10.1038/jid.2010.364](https://doi.org/10.1038/jid.2010.364) PMID: 21150926
40. Umegaki-Arao N, Pasmooij AM, Itoh M, Cerise JE, Guo Z, Levy B, et al. Induced pluripotent stem cells from human revertant keratinocytes for the treatment of epidermolysis bullosa. *Sci Transl Med*. 2014;6(264). DOI: [10.1126/scitranslmed.3009342](https://doi.org/10.1126/scitranslmed.3009342) PMID: 25429057
41. Itoh M, Umegaki-Arao N, Guo Z, Liu L, Higgins CA, Christiano AM. Generation of 3D skin equivalents fully reconstituted from human induced pluripotent stem cells (iPSCs). *PLoS One*. 2013;8(10):e77673. DOI: [10.1371/journal.pone.0077673](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0077673) PMID: 24147053
42. Shinkuma S, Guo Z, Christiano AM. Site-specific genome editing for correction of induced pluripotent stem cells derived from dominant dystrophic epidermolysis bullosa. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2016;113(20):5676-81. DOI: [10.1073/pnas.1512028113](https://doi.org/10.1073/pnas.1512028113) PMID: 27143720
43. Itoh M, Kiuru M, Cairo MS, Christiano AM. Generation of keratinocytes from normal and recessive dystrophic epidermolysis bullosa-induced pluripotent stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011;108(21):8797-802. DOI: [10.1073/pnas.1100332108](https://doi.org/10.1073/pnas.1100332108) PMID: 21555586
44. Gostyrński A, Llamas S, García M, Escamez MJ, Martínez-Santamaria L, Nijenhuis M, et al. Long-term survival of type XVII collagen revertant cells in an animal model of revertant cell therapy. *J Invest Dermatol*. 2014;134(2):571-4. DOI: [10.1038/jid.2013.308](https://doi.org/10.1038/jid.2013.308) PMID: 23884316
45. Tolar J, McGrath JA, Xia L, Riddle MJ, Lees CJ, Eide C, et al. Patient-specific naturally gene-reverted induced pluripotent stem cells in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *J Invest Dermatol*. 2014;134(5):1246-54. DOI: [10.1038/jid.2013.523](https://doi.org/10.1038/jid.2013.523) PMID: 24317394
46. Itoh M, Kawagoe S, Tamai K, Okano HJ, Nakagawa H. Integration-free T cell-derived human induced pluripotent stem cells (iPSCs) from a patient with recessive dystrophic epidermolysis bullosa (RDEB) carrying two compound heterozygous mutations in the COL7A1 gene. *Stem Cell Res (Amst)*. 2016;17(1):32-5. DOI: [10.1016/j.scr.2016.05.003](https://doi.org/10.1016/j.scr.2016.05.003) PMID: 27558600
47. Khurana P, Kolundzic N, Rogar M, Hobbs C, Wong XF, Common JE, et al. Stem Cell Research Lab Resource: stem Cell Line Induced pluripotent stem cell (iPSC) line MLI-003A derived from an individual with the maximum number of filaggrin (FLG) tandem repeats. *Stem Cell Res (Amst)*. 2020;45:101827. DOI: [10.1016/j.scr.2020.101827](https://doi.org/10.1016/j.scr.2020.101827) PMID: 32361315
48. Miura K, Okada Y, Aoi T, Okada A, Takahashi K, Okita K, et al. Variation in the safety of induced pluripotent stem cell lines. *Nat Biotechnol*. 2009;27(8):743-5. DOI: [10.1038/nbt.1554](https://doi.org/10.1038/nbt.1554) PMID: 19590502
49. Hewitt KJ, Shamis Y, Hayman RB, Margvelashvili M, Dong S, Carlson MW, et al. Epigenetic and phenotypic profile of fibroblasts derived from induced pluripotent stem cells. *PLoS One*. 2011;6(2):e17128. DOI: [10.1371/journal.pone.0017128](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0017128) PMID: 21386890