

# *Quo vadis, hematológia?*

Matula Zsolt PhD-hallgató<sup>1</sup> ■ Kudlik Gyöngyi PhD-hallgató<sup>1</sup>  
Urbán S. Veronika dr.<sup>2</sup> ■ Uher Ferenc dr.<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet, Budapest

<sup>2</sup>Semmelweis Egyetem, Egészségtudományi Kar, Morfológiai és Fiziológiai Tanszék, Budapest

<sup>3</sup>Országos Vérellátó Szolgálat, Budapest

A vérképző rendszert évtizedeken keresztül szigorúan kompartmentalizált sejtmegeújulási rendszerként képzeltük el, ami önfenntartó, multipotens őssejtekből, a belőlük keletkező – ugyancsak multipotens –, de később myeloid vagy lymphoid irányba elköteleződő elődsejtekből, valamint a különböző típusú érett vörsejtek – fejlődésük utolsó szakaszában már unipotens – prekursor sejtjeiből áll. A legújabb kutatások azonban számos olyan új eredményt hoztak, amelyek nem egyeztethetők össze a haematopoiesis e „klasszikus”, hierarchikus modelljével. Egyértelművé vált, hogy a csontvelői haematopoieticus őssejt-populáció heterogén, különböző osztódási és differenciálódási képességű őssejtekből áll. További – részben bonyolult genetikai manipulációkon alapuló – kísérletekben azt is igazolták, hogy a felnőttkori egyensúlyi vérképzés elsősorban hosszú életű, unipotens elődsejtek működésén alapul, és a haematopoieticus őssejtek nem vagy legfeljebb minimális mértékben vesznek részt a folyamatban. Az is kiderült, hogy ez a fiziológiai vérképzés erősen különbözik az őssejt-transzplantációt követően kialakuló haematopoiesistől. Összességében tehát alaposan újra kell gondolnunk mind a normális, mind a patológiai vérképzés szabályozásáról korábban kialakult képünket. *Orv. Hetil.*, 2016, 157(46), 1819–1829.

**Kulcsszavak:** egyensúlyi vérképzés, elődsejtek, haematopoieticus őssejtek, haematopoiesis, sejtfejlődésisor-követés, sejtszintű DNS/RNS szekvenálás

## *Quo vadis hematology?*

For decades, developing hematopoietic cells have been strictly compartmentalized into a small population of multipotent self-renewing hematopoietic stem cells, multipotent hematopoietic progenitor cells that are undergoing commitment to myeloid or lymphoid fates, and unipotent precursor cells that mature towards peripheral blood and immune cells. Recent studies, however, have provided a battery of findings that cannot be explained by this “classical” hierarchical model for the architecture of hematopoiesis. It is emerging that heterogeneous hematopoietic stem cell populations in the bone marrow coexist, each with distinct, preprogrammed differentiation and proliferation behaviors. Three subsets can be distinguished among them: myeloid-biased ( $\alpha$ ), balanced ( $\beta$ ), and lymphoid-biased ( $\gamma/\delta$ ) hematopoietic stem cells. The ratio of these hematopoietic stem cell subsets is developmentally regulated in the foetal liver and hematopoietic stem cells adult bone marrow, and coordinately gives rise to hematopoiesis. Beta- and  $\gamma/\delta$ -hematopoietic stem cells are found predominantly early in the life of an organism, whereas  $\alpha$ -hematopoietic stem cells accumulate in aged mice and humans. In addition, new sophisticated genetic experiments in mice have identified a major role of long-lived, committed progenitor cells downstream from hematopoietic stem cells as drivers of normal adult hematopoiesis, and revealed that post-transplantation hematopoiesis differs qualitatively and quantitatively from normal steady-state hematopoiesis. These findings have important implications for understanding *in situ* the regulation of haematopoiesis in health and disease.

**Keywords:** clonal tracking, hematopoiesis, hematopoietic stem cells, progenitor cells, single-cell DNA/RNA sequencing, steady-state hematopoiesis

Matula, Zs., Kudlik, Gy., Urbán, S. V., Uher, F. [*Quo vadis hematology?*]. *Orv. Hetil.*, 2016, 157(46), 1819–1829.

(Beérkezett: 2016. július 26.; elfogadva: 2016. augusztus 31.)

**Rövidítések**

CLP = (common lymphoid progenitor) közös lymphoid elődsejt; CMP = (common myeloid progenitor) közös myeloid elődsejt; Ery = (erythroid progenitor) erythroid elődsejt; GMP = (granulocyte/monocyte progenitor) granulocytá/monocytá elődsejt; HSC = haematopoieticus őssejt; LMPP = (lymphoid primed multipotent progenitor) lymphoid „primed” multipotens elődsejt; LT-HSC = (long-term repopulating ability hematopoietic stem cell) tartós repopulációra képes haematopoieticus őssejt; Meg = (megakaryocyte progenitor) megakaryocytá elődsejt; MegE = (megakaryocyte/erythrocyte) megakaryocytá/erythrocytá; MEP = (megakaryocyte/erythroid progenitor) megakaryocytá/erythroid elődsejt; MPP = (multipotent progenitor) multipotens elődsejt; MyRP = (myeloid-restricted progenitor) myeloid „korlátozott” elődsejt; ST-HSC = (short-term repopulating ability hematopoietic stem cell) átmeneti repopulációra képes haematopoieticus őssejt; TF = (transcription factor) transzkripció faktor; vWF = (von Willebrand factor) von Willebrand-faktor

A vérképző rendszer kutatása hosszú ideig főként a különböző sejtfelszíni markerekkel, illetve markerkombinációkkal jellemezhető (1. táblázat) ő- és elődsejt-populációk, áramlási citometriás vagy specifikus ellenanyagokkal fedett mágneses gyöngyökkel történt izolálásán alapult. Az így nyert „tisztított” (valójában inkább dúsított) sejt-populációkat részben *in vitro* módszerekkel – kolóniaképzés, génkifejeződés stb. – jellemezték, részben myeloablatált recipiensekbe oltották, ami lehetővé tette a különböző sejtek önfenntartó és repopulációs képességének *in vivo* vizsgálatát is. Később, a génmanipulációs módszerek fejlődésével, az *in vitro* kultúrában megjelölt, majd transzplantált sejtek leszármazási viszonyait is sikerült – legalábbis részben – tisztázni. További előrelépést jelentett a különböző génmanipulált (*knock out* és *knock in*) állatok vérképzésének vizsgálata, ami mélyebb bepillantást engedett a haematopoesis genetikai szabályozásába [1, 2]. Dolgozatunkban először röviden összefoglaljuk a haematopoesisről így kialakult, ma már klasszikusnak mondható képet. Ezután áttérünk az elmúlt években, elsősorban a vizsgálómódszerek fejlődésének köszönhetően született, meglepő új eredmények bemutatására, különös tekintettel a vérképző őssejtkompartment heterogenitásának és az egyensúlyi vérképzés mechanizmusának az ismertetésére.

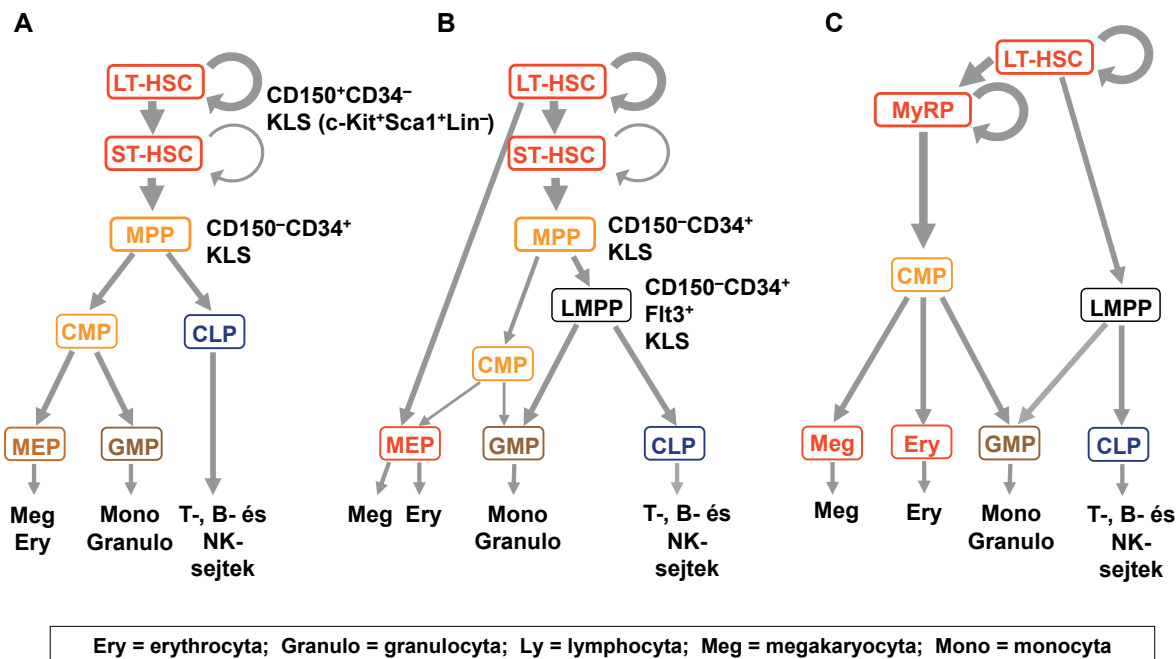
**A vérképzés hagyományos modellje**

A vérképző rendszer egy hierarchikus felépítésű sejtmegeújulási rendszer, amelynek működését részben sejten belüli (genetikai és epigenetikai) faktorok, részben a haematopoieticus ő- és elődsejtek mikrokozmoszójából (*niche*) érkező jelzések szabályozzák. A haematopoieticus hierarchia csúcán a tartós repopulációra képes (long term – LT), multipotens vérképző őssejtek (HSC) találhatóak. Önfenntartó populációjuk egész életünk során biztosítja az érett, rövid életű vörsejtek folyamatos pótlá-

**1. táblázat** | A vérképző ő- és elődsejtek legfontosabb sejtfelszíni markerei

Sejtek	Sejtfelszíni markerek	
	Egér	Ember
Tartós repopulációra képes vérképző őssejtek (LT-HSC)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>+</sup> Sca1 <sup>+</sup> Flk2 (CD135) <sup>-</sup> CD34 <sup>-</sup> CD150 <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> CD90 <sup>+</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD117 <sup>+</sup>
Átmeneti repopulációra képes vérképző őssejtek (ST-HSC)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>+</sup> Sca1 <sup>+</sup> Flk2 (CD135) <sup>-</sup> ? CD34 <sup>low</sup> CD150 <sup>+</sup>	
Multipotens elődsejtek (MPP)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>+</sup> Sca1 <sup>+</sup> Flk2 (CD135) <sup>+</sup> CD34 <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> CD90 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD135 <sup>+</sup>
Közös lymphoid elődsejtek (CLP)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>low</sup> Sca1 <sup>low</sup> Flk2 (CD135) <sup>+</sup> IL7R $\alpha$ (CD127) <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>-</sup> CD90 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>
Közös myeloid elődsejtek (CMP)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>+</sup> Sca1 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16/32 <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD90 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD123 (IL3R $\alpha$ ) <sup>low</sup> CD135 <sup>+</sup>
Megakaryocytá-erythrocytá elődsejtek (MEP)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>+</sup> Sca1 <sup>-</sup> CD34 <sup>low</sup> CD16/32 <sup>-</sup> CD150 <sup>+</sup>	Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD90 <sup>-</sup> CD45RA <sup>-</sup> CD123 (IL3R $\alpha$ ) <sup>-</sup> CD135 <sup>-</sup>
Granulocytá-monocytá elődsejtek (GMP)	Lin <sup>-</sup> c-Kit (CD117) <sup>+</sup> Sca1 <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD16/32 <sup>+</sup> CD150 <sup>-</sup>	Lin <sup>-</sup> CD34 <sup>+</sup> CD38 <sup>+</sup> CD90 <sup>-</sup> CD45RA <sup>+</sup> CD123 (IL3R $\alpha$ ) <sup>+</sup> CD135 <sup>+</sup>

sát és az immunrendszer sejtjeinek megújulását. Intravénás adásukkal egy myeloablatált recipiens (kísérleti állat vagy beteg) teljes lymphohaematopoieticus rendszere is tartósan (egérben 16 hétnél hosszabb időre) helyreállítható. Az LT-HSC-k a felnőttcsontvelőben általában aszimmetrikusan osztódnak, azaz két, eltérő leánysejtet hoznak létre. Az egyik leánysejt megegyezik a szülői őssejttel, tehát az LT-HSC kompartment fenntartásában vesz részt, a másik leánysejt viszont osztódní és differenciálódni kezd. Belőle úgynevezett átmeneti repopulációra képes (short term – ST) – azaz részben még önfenntartó – HSC-k, majd multipotens elődsejtek (MPP) keletkeznek. Utóbbi sejt-populáció már nem önfenntartó, viszonylag rövid életű, gyorsan osztódó, és potenciálisan még bármely vérsajtfejlődési sor irányába differenciálódni képes sejtekből áll. Innentől kezdve a vérképzés „fája” elágazik (1/A ábra és 1. táblázat). Az MPP-kből lymphoid és myeloid irányba elkötelezett, közös lymphoid (CLP), illetve közös myeloid (CMP) elődsejtek jönnek létre. A CLP-kből származnak a lymphocyták, a T-, a B- és az NK-sejtek prekurzorai, míg a CMP-k leánysejtjeiből – újabb bifurkáció révén – megakaryocytá/erythroid (MEP) és granulocytá-macrophag elődsejtek (GMP) keletkeznek. Azaz a „fejlődési fa” minden elágazása (bifurkációja) korlátozottabb differenciálódási képességű elődsejtek kialakulásával jár. Míg a CMP-kből még erythrocyták, megakaryocyták, granulocyták és mo-



1. ábra | A vérképzés hagyományos modellje (A) és annak javított változatai (B és C)

nocyták egyaránt keletkezhetnek, addig a MEP-ek már csak megakaryocyta vagy erythrocyta, a GMP-k pedig granulocyta vagy macrophag irányba képesek tovább differenciálódni. A vérszövetek fejlődése – azaz a HSC-k, illetve MPP-k egyes vérszövetfejlődési sorok irányába történő elköteleződése és érése – tehát szigorúan egyirányú folyamat, amelynek során folyamatosan szűkül a sejtek potenciálja. Először önfenntartó képességüket veszítik el, majd – lépcsőről lépcsőre – differenciálódási képességük is csökken, egészen az unipotens (már csak egyetlen típusú érett vérszövetet létrehozni képes) prekursor sejt állapotig [3, 4].

A különböző vérszövetfejlődési sorok irányába történő elköteleződés legfontosabb molekuláris szabályozói az úgynevezett mester transzkripciós faktorok (TF). Az őssejtekre még a „genetikai promiskuitás” a jellemző, ami azt jelenti, hogy a HSC-k genomja meglehetősen nyitott, így bennük – igaz alacsony szinten – a legtöbb, a haematopoiesisben meghatározó szerepet játszó TF kifejeződik. Vagyis a HSC-k többféle genetikai program végrehajtására is felkészült (*primed*) sejtek. Az elköteleződés (*commitment*) csak akkor következik be, amikor egy adott sejtnek megfelelő TF-nek, illetve TF-kombinációnak a kifejeződése megnő valamelyik sejtben, míg a más sejtfejlődési sorok érését irányító TF-eké gátlás alá kerül. A döntés, hogy milyen irányú legyen egy adott sejt elköteleződése, sokak szerint főként a génkifejeződés véletlenszerű változásain alapul, azaz *sztochasztikus* folyamat. Mások szerint viszont a döntő lépések genetikailag meghatározottak, vagyis a haematopoiesis alapvetően *determinisztikus* elven működik. Ugyanakkor az őssejtek közvetlen mikro környezetének, a „*niche*”-nek a szerepe

sem elhanyagolható a vérképző sejtek sorsának alakításában [5, 6].

Továbblépést jelentett, amikor *Adolfsson és mtsai* [7] az MPP-populáción belül azonosítottak egy szűkebb differenciálódási képességű – általuk lymphoid „*primed*” multipotens elődsejteknek (lymphoid primed multipotent progenitors – LMPP) nevezett – szubpopulációt, amibe olyan, Flt3<sup>+</sup> (FMS-like tyrosine kinase 3 pozitív) sejtek tartoznak, amelyek a lymphoid irányú differenciálódást biztosító gének (*IL-7r*, *IgH*, *Rag1*) kifejezése mellett myeloid (granulocyta, monocyta) irányú felkészültségüket is megőrzik. A sejtek esetleges megakaryocyta és/ vagy erythrocyta (MegE) irányú differenciálódásához szükséges gének kifejeződése azonban alig 1%-ukban mutatható ki (ez bőven az áramlási citometriás izolálás hibahatárán belül van), és *in vitro* kultúrában is legfeljebb 1–3%-uk képez megakaryocyta- vagy erythrocytakolonitát. Ugyanakkor az egyes izolált, klonogén LMPP-k több mint 70%-a rendelkezik lymphomyeloid irányú differenciálódási képességgel. Később azt is sikerült igazolni, hogy gyakorlatilag sem a HSC-k között, sem a különböző elődsejtkompartimentben nincsenek olyan sejtek, amelyek egyidejűleg fejtenének ki a lymphoid, illetve a MegE irányú fejlődés során nélkülözhetetlen géneket. A lymphoid sejtekre jellemző gének először az LMPP-kben expresszálódnak [8, 9]. A vérképzés fentiek alapján javított modellje (1/B ábra) tehát – a „klasszikus” modellhez (1/A ábra) hasonlóan – a vérképző ő- és elősejtek potenciáljának (differenciálódási képességének) egy hierarchikus rend szerinti, sorozatos bifurkációk révén megvalósuló, lépcsőről lépcsőre történő csökkenésén alapul. Eltér viszont a két modell abban, hogy az elköteleződés és differenciálódás más-más lépéséhez kötik a myeloid és lym-

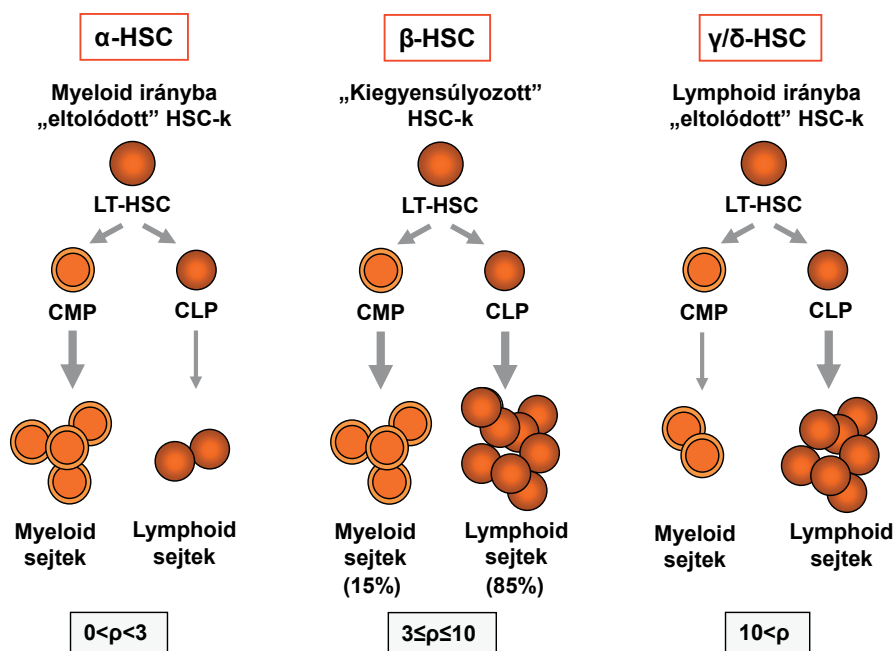
phoid fejlődési út szétválását, ráadásul a javított modell szerint egyes érett vörösvérsejtek – nevezetesen a granulocyták és monocyták – többféle fejlődési úton, CMP-ken és LMPP-ken keresztül is létrejöhetnek. *Yamamoto és mtsai* [10] viszont egy olyan myeloid „korlátozott” elődejt (myeloid-restricted progenitor – MyRP) populációt írtak le, amelynek tagjai meglepően hosszú életűek *in vivo*. Szerintük a myeloablált kísérleti állatokba oltott MyRP-k mintegy 64%-a nyolc hétnél is hosszabb ideig képes repopulálni a recipiensek vörösvérsejtjeit, megakaryocytáit, granulocytáit és monocytáit. Ebben tehát alapvetően különböznek az MPP-ktől és LMPP-ktől, amelyek legfeljebb 2–3 hetes repopulációra képesek. *In vitro* sejtenyészetben a MyRP-k 24, 24, illetve 7%-a képez Meg-, myeloid- vagy MegE-kolóniát. Ráadásul egy HSC aszimmetrikus osztódása során keletkező két leánysejt párhuzamos (más-más recipiensbe történő) transzplantációja azt mutatta, hogy a MyRP-k minden más elődejtnél korábban, közvetlenül a HSC-ktől képződnek. Mindez arra utal, hogy az érett vörösvérsejtek, megakaryocyták és myeloid sejtek jórésze ebből a többé-kevésbé önfenntartó MyRP-populációból, az úgynevezett myeloid „megkerülő” (bypass) úton (*1/C ábra*) keletkezik. Mivel a MyRP-k döntően CD150-pozitívok is, elképzelhető, hogy azonosak lehetnek a később tárgyalandó, von Willebrand-faktor- (vWF-) pozitív HSC-ekkel [9, 11]. Az elmúlt évtizedben azonban számos olyan új kísérleti módszert sikerült kidolgozni, amelyek alkalmazása több ponton is megkérdőjelezte a fenti – a vérképző rendszer felépítéséről és működéséről kialakított – viszonylag egyszerű, de meglehetősen merev, hierarchikus modell létjogosultságát. Közülük talán a legfontosabbak azok az új generációs (más néven deep sequencing-nek, azaz „mély” szekvenálásnak is nevezett) módszerek, amelyek lehetővé tették több száz, sőt több ezer sejt genetikai anyagának (DNS-molekulájának) és transzkriptomjának (teljes mRNS-készletének) párhuzamos, sejtszintű elemzését. A DNS-molekula, valamint az adott sejtben pillanatnyilag kifejeződő összes mRNS-molekula nukleotidszekvenciájának meghatározása (scDNAseq és scRNAseq = single-cell DNA/RNA sequencing), illetve összehasonlítása teljesen új megvilágításba helyezte a génkifejeződés – a felkészülés (priming) és az elköteleződés (commitment) – molekuláris szintű lépéseit. Ezek a módszerek ma már jórészt automatizáltak, a munkát főként robotok végzik, a kapott óriási adattömeg elemzése azonban komoly bioinformatikai háttérrel és szakudást igényel [12]. Érzékenységről talán csak annyit, hogy egy emberi sejtben általában <1 pg mRNS található. Ráadásul a transzkriptumok több mint 85%-a 100-nál kevesebb kópiában van jelen a sejtben, sőt vannak olyan – alacsony szinten kifejeződő – gének is, amelyek csak 5–20 RNS-másolattal „képviseltetik magukat” a transzkriptomban, nukleotidszekvenciájuk mégis meghatározható [13]. Ugyancsak jelentős előrelépést jelentett számos új sejtfejlődés-sor-követési (lineage tracing) eljárás kidolgozása. Ezek közé tartoznak a korábbiaknál érzékenyebb DNS-vonalkódo-

lás (barcoding) vagy a vírusvektorok helyett transzpozontranszpozáz rendszereket használó módszerek. Az úgynevezett fluoreszcens intravitális mikroszkópia segítségével pedig mintegy „ablakon át” bele tudunk nézni az élő szervezetbe, és így – invazív technikák alkalmazása nélkül – *in situ* is követni tudjuk a megfelelő fluoreszcens jelzéssel ellátott sejtek sorsát és működését kísérleti állatainkban [14, 15].

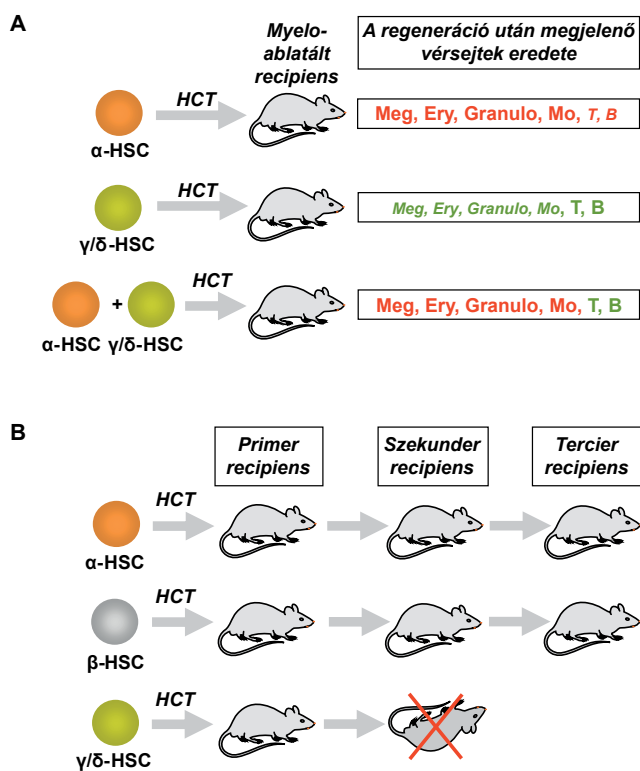
## A vérképző őssejtek heterogenitása

Az új vizsgálómódszerekkel kapott eredmények felhasználásával kialakított kép mára a következőképpen fest. A myeloablált recipiensekbe oltva tartós repopulációra képes HSC-kompartiment heterogén, három jól elkülöníthető sejtcsoportból (altípusokból, szubpopulációkból) áll. Ezek a transzplantációt követően eltérő arányban vesznek részt a különböző vörösvérsejtfejlődési sorok kialakításában, mivel mindegyikük egyedi, a másik két csoportba tartozó HSC-ktől eltérő önfenntartási és differenciálódási programmal rendelkezik. Az úgynevezett „kiegyenlített” (balanced) vagy  $\beta$ -HSC-k sorozatos transzplantáció után is a fiziológiásnak megfelelő arányban hoznak létre myeloid, illetve lymphoid sejteket a recipiens állatokban. Vagyis a  $\beta$ -HSC-ekkel oltott egerek vérében – a beavatkozás után 4–6 hónappal – az összes leukocytá körülből 15%-a lesz myeloid és 85%-a lymphoid sejt. Más szóval – a kísérleti hibákat is figyelembe véve – a myeloid és lymphoid sejtek aránya (p) 3 és 10 között lesz a keringésben (*2. ábra*). A „myeloid irányba eltolódott” (myeloid-biased) vagy  $\alpha$ -sejtek transzplantációja után viszont ez az arány  $0 < p < 3$ . Hozzá kell tenni, hogy a „myeloid irányba eltolódott” elnevezés félrevezető, helyesebb lenne lymphoid deficiens HSC-kről beszélni, mivel az  $\alpha$ -sejtekből körülbelül ugyanannyi myeloid sejt keletkezik, mint a „kiegyenlített”  $\beta$ -sejtekből, lymphoid irányba azonban kevésbé differenciálódnak. Hasonló a helyzet a „lymphoid irányba eltolódott” (lymphoid biased) vagy  $\gamma/\delta$ -HSC-ekkel. Ezek fiziológiás mennyiségű lymphoid, de kevés myeloid sejtet hoznak létre, azaz valójában myeloiddeficiens őssejtek [16–19].

A három HSC-altípus közti különbség különösen a sejtek együttes transzplantációja során válik egyértelművé. Ha  $\alpha$ - és  $\gamma/\delta$ -HSC-eket egyidejűleg oltunk myeloablált egerekbe, a recipiensekben kialakuló új vérképző rendszer  $\alpha$ -HSC-eredetű myeloid és  $\gamma/\delta$ -HSC-eredetű lymphoid sejtekből fog állni (*3/A ábra*). Ugyanakkor a csak  $\alpha$ -sejtekkel oltott állatokban kialakuló lymphoid sejtek természetesen  $\alpha$ -HSC-eredetűek. A csak a  $\gamma/\delta$ -HSC-ekkel transzplantált egerekben viszont a myeloid sejtek is a  $\gamma/\delta$ -HSC-k leszármazottai [20, 21]. Mindez arra utal, hogy a HSC-k differenciálódási képességének „eltolódását” meghatározó endogén genetikai program – pontosabban eltérő epigenetikai mintázat – elsősorban a felkészülés (priming) és kevésbé az elköteleződés (commitment) szintjén érvényesül, és ezért környezeti hatásokra – legalábbis részben – megváltozhat. Ez törté-

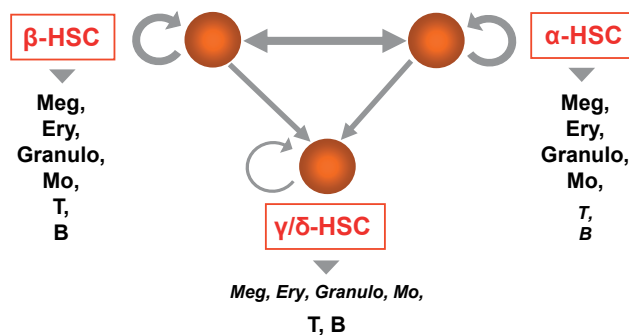


2. ábra | A vérképző őssejtek heterogenitása



3. ábra | A különböző HSC-altípusok repopulációs (A) és önfenntartó (B) képessége különböző

nik akkor, amikor valamelyik HSC-altípus hiányzik a rendszerből (csak  $\alpha$ - vagy csak  $\gamma/\delta$ -HSC-kkel transzplantált állatok), és az érintett őssejt a rá kevésbé jellemző irányokba is „kénytelen” differenciálódni. Kompetíció esetén ( $\alpha$  plusz  $\gamma/\delta$ -HSC-kkel transzplantált állatok) vi-



4. ábra | A HSC-kompartmenten belüli hierarchia

szont már érvényesül az adott altípusra jellemző „eltolódás”.

A különböző HSC-altípusokba tartozó őssejtek néhány markerük alapján is azonosíthatók és izolálhatók. A  $Lin^- c-Kit^+ Scf1^+ CD34^- CD150^+$  egérsontvelői sejt-populációban belül az erősen  $CD150$ -pozitív HSC-k rendelkeznek a legnagyobb önfenntartó és repopulációs képességgel. Minden sejtfejlődési sor irányába képesek differenciálódni, de elsősorban myeloid sejteket képeznek, azaz  $\alpha$ - és (részben)  $\beta$ -sejtek. A legkevésbé  $CD150$ -et kifejező  $Lin^- c-Kit^+ Scf1^+ CD34^- CD150^+$  HSC-k viszont egyértelműen a  $\gamma/\delta$ -sejtekkel azonosíthatók [21, 22]. A  $c-Kit$ , egy másik fontos HSC-marker expressziója viszont pont ellentétes irányba változik. A legtöbb  $c-Kit$ -molekula a  $\gamma/\delta$ -sejteken mutatható ki [23]. Ugyanez mondható el a  $c-myb$  gén, illetve fehérje kifejeződéséről [24]. Az emberi HSC-k esetében csak annyi biztos, hogy a legjobb „minőségű”, legfiatalabb őssejtek még  $CD34$ -negatívok. A  $CD34$  kifejeződése a HSC-k felszínén már az őssejtérés egy későbbi fázisára jellemző [25].

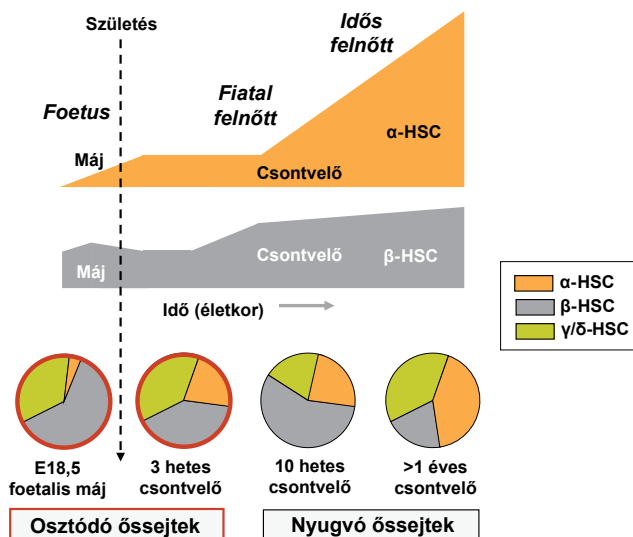
Az egyes HSC-klónok – amik az egy adott őssejtből keletkezett leány-HSC-k, valamint előd- és végdifferenciálódott sejtek összességéből állnak – élettartama eltérő, néhány hónaptól akár 5 évig is terjedhet. Egy klónon belül azonban az összes leány-HSC élettartama azonos, és szekunder recipiensbe oltva hasonló repopulációs kinetikát mutatnak akkor is, ha az egyes sejteket szeparáltan, más-más recipiensbe oltjuk. Vagyis a különböző HSC-k élettartamát is egy endogén genetikai/epigenetikai program, illetve mintázat határozza meg [26]. Ez akkor is igazolható, ha a különböző klónok között kompetíció van, vagyis nemcsak egy, hanem egyidejűleg számos – vírusvektor mediált DNS-„vonalkódolás” (barcoding) megjelölt – klón sorsát követjük párhuzamosan nyomon a transzplantált állatokban [27, 28]. Ráadásul szoros összefüggés van az egyes klónok élettartama és önfenntartó képessége között is. Sorozatosan, vagyis újabb és újabb recipiensbe csak a leghosszabb élettartamú  $\alpha$ -HSC-k és a  $\beta$ -sejtek transzplantálhatók. Ezek még tercier recipiensbe oltva is képesek új vérképző rendszert kialakítani. A legrovidebb élettartamú  $\gamma/\delta$ -HSC-k viszont csak egyszer transzplantálhatók, vagyis a primer recipiensben még működnek ugyan, szekunder recipiensben azonban már nem (3/B ábra). Mivel az egyes HSC-altípusok a sorozatos transzplantációjuk során is döntően (95%-ban) megőrzik eredeti specifikációjukat (myeloid irányba eltolódott, illetve kiegyenlített), a köztük fenálló különbségeikért felelős genetikai/epigenetikai háttér meglehetősen stabilnak tűnik. Ennek ellenére a háromféle HSC-altípus között – bizonyos esetekben – lehetséges átmenet. Feltételezik, hogy  $\gamma/\delta$ -HSC-k mind az  $\alpha$ -, mind a  $\beta$ -sejtekből keletkezhetnek. Utóbbi altípusok egymásba is átalakulhatnak, de a  $\gamma/\delta$ -sejtekből már soha nem keletkezhetnek  $\alpha$ - vagy  $\beta$ -HSC-k (4. ábra) [18, 19, 29].

Szintén a különböző HSC-altípusok közötti hierarchiára utal, hogy a  $\text{Lin}^- \text{c-Kit}^+ \text{Sca1}^+ \text{CD34}^- \text{CD48}^- \text{CD150}^+$  egércsontvelői sejtpopuláción belül von Willebrand-faktor- (vWF-) pozitív és negatív sejtek egyaránt előfordulnak. *Sanjuan-Pla és mtsai* szerint a hierarchia csúcsán a  $\text{vWF}^+$  HSC-k állnak, ezek a legfiatalabb, legnagyobb repopulációs és önfenntartó képességű vérképző őssejtek [11].  $\text{vWF}$ -pozitív sejtek az  $\alpha$ - és a  $\beta$ -HSC-k között egyaránt előfordulnak, míg a  $\gamma/\delta$ -HSC-k  $\text{vWF}$ -negatívak. Ráadásul a „megakaryocita irányba eltolódott” HSC-ktől keletkezhetnek  $\text{vWF}^-$  sejtek, ennek fordítottja azonban nem figyelhető meg. Az is kétségtelen, hogy sejt szintű génextpressziós analízis során az egér-HSC-k egy része egy elkötelezett elődsejt-populációval azonos klaszterbe kerül, ami a  $\text{vWF}$ -et kódoló gént és más myeloid géneket tartalmaz [30], tehát valóban létezhet egy „megakaryocita irányba eltolódott” őssejtaltípus. Emberben közvetlenül még nem igazolt a  $\text{vWF}$ -pozitív HSC-k létezése, de a köldökzsinórvérben és a csontvelőben található HSC-k és MegE elődsejtek génextpressziós profilja nagyon hasonló [31]. (Ugyanakkor nem zárható ki teljesen, hogy a megakaryocita irányú elköteleződést biztosító génekről – köztük a  $\text{vWF}$ -et kódoló génről – gyorsabban történik

a transzkripció és a transláció, mint amennyi idő alatt a HSC-k és az elődsejtek osztódnak, illetve fenotípusuk [sejtfelszíni marker kombinációjuk] megváltozik. Ezért tűnik úgy, mintha a HSC-k közvetlenül, az elődsejt állapotot kihagyva köteleződnének el megakaryocita irányba.)

A HSC-kompartment összetétele, azon belül a három őssejtaltípus aránya életünk során folyamatosan változik. A foetalis egérmájban az  $\alpha$ -HSC-k aránya kevesebb mint 5–10% (E18,5) születés után, a háromhetes csontvelőben azonban már ennek három-négyszerese. Fiala felnőttkorban arányuk meglehetősen stabil. Idős állatokban (1 éves kor felett) viszont ismét ugrásszerűen nő és akár az 50%-ot is megközelíti (5. ábra) [19, 32]. Hasonló változás történik emberben is az életkor előrehaladtával. Ezt mutatja, hogy ha idős emberekből származó HSC-eket immundeficiens egerekbe oltanak, jóval nagyobb arányban keletkeznek myeloid sejtek, mint a fiatal donorokól származó HSC-k transzplantációja után [33]. Érdekes módon az  $\alpha$ -HSC-k aránya akkor kezd növekedni az egérembrióban, amikor a HSC-k a foetalis májból a csontvelőbe vándorolnak, tehát a folyamat még a születés előtt megindul. Ennek okát nem ismerjük, de elképzelhető, hogy a mikrokozony (az őssejt-„niche”) változása okozza. Vagyis az  $\alpha$ -sejteknek nagyobb a túlélési esélyük a csontvelőben, mint a  $\beta$ -sejteknek. A kétféle *niche* közti egyik lényeges különbség az, hogy a foetalis májban egy epesav – a taurokolsav – chaperonként funkcionál. Hatására a HSC-ben – a fokozott fehérjeszintézis ellenére is – mérsékelt marad az ER-stressz, csökken az újonnan képződött fehérjék aggregálódása [34]. Természetesen az sem zárható ki, hogy a  $\beta$ -sejtek egy részéből keletkeznek  $\alpha$ -sejtek. Mindenesetre ez a változás nem függ össze a HSC-k nagy részének sejtciklusból történő kilépésével, mivel az csak a születés utáni harmadik hét végén következik be. Addig – mind a foetalis májban, mind a csontvelőben – gyakorlatilag minden HSC naponta osztódik. A harmadik hét után viszont az őssejtek 90–95%-a nyugalmi állapotba kerül a csontvelőben, és a továbbiakban már csak igen ritkán (~100–150 naponként) osztódik. Azt nem tudjuk, hogy az emberi csontvelőben pontosan mikor kerülnek nyugalomba a HSC-k. Becslések szerint talán valamikor 1–3 éves korban szűnhet meg folyamatos osztódásuk [35, 36].

Az életkor mellett külső tényezők – elsősorban az őssejtek mikrokozonyában (*niche*) kifejeződő citokinek – is befolyásolhatják a különböző HSC-altípusok aktuális arányát. A jelek szerint a TGF- $\beta$  elsősorban az  $\alpha$ -sejtek, míg az SCF, Il-11 és Flt2 ligandum a  $\gamma/\delta$ -sejtek szaporodását segíti elő [18, 20, 37]. Ez egyben azt is valószínűsíti, hogy a különböző HSC-altípusok részben eltérő mikrokozonyban érezhetik otthon magukat. Feltehetően a vérképző őssejt *niche* más-más – sejt összetételében és funkciójában eltérő – területén helyezkedhetnek el *in vivo*. A csontvelői őssejt *niche* heterogenitása ma már egyértelmű [38], a különböző HSC-altípusok *in situ* azonosítása azonban még várat magára.

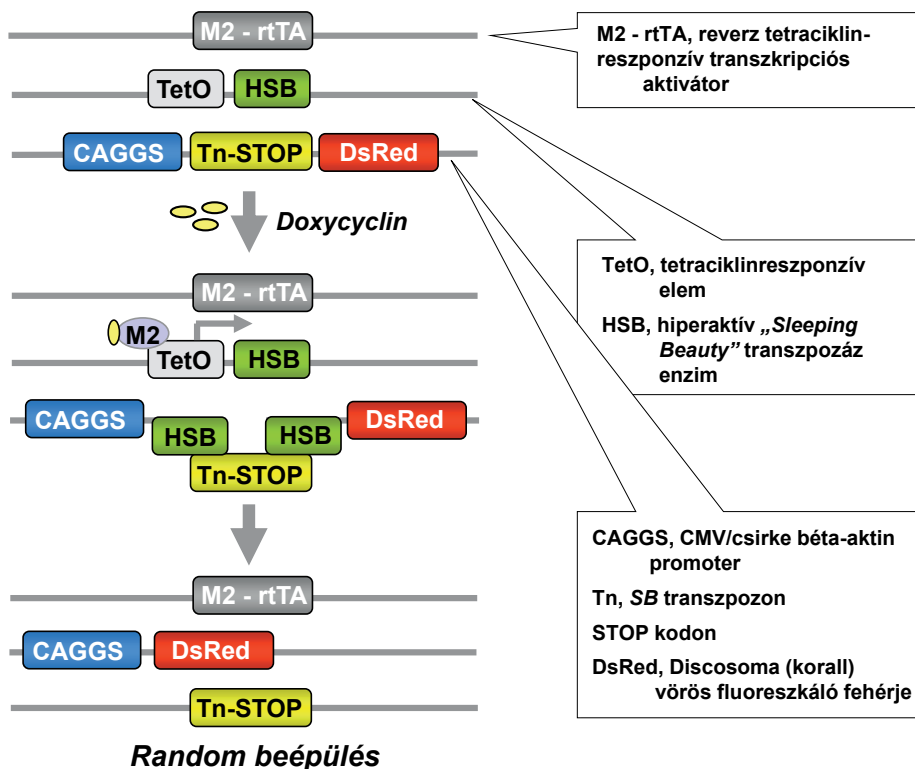


5. ábra | A HSC-kompartment összetétele életünk során folyamatosan változik

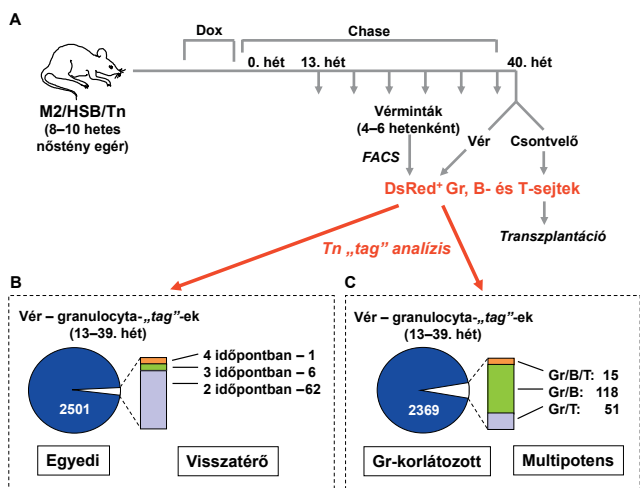
### Egyensúlyi vérképzés

Évtizedeken keresztül általánosan elfogadott volt, hogy a HSC-k myeloablatált recipiensekbe történő transzplantációja után kialakuló vérképző rendszer felépítése és működése híven tükrözi a fiziológiás körülmények között (az ontogenezis során) kialakuló, egyensúlyi haematopoiesis legfontosabb jellemzőit. Valójában – megfelelő kísérleti rendszer(ek) hiányában – utóbbi közvetlen viz-

gálatára egészen a közelmúltig nem is volt lehetőség. 2014-ben aztán *Fernando Camargo munkacsoportja* (Harvard Stem Cell Institute, Boston) olyan hármastranzgenikus (*M2-rtTA/HSB/Tn*) egereket hozott létre, amelyeknek genomja egy doxycyclinnel indukálható *Sleeping Beauty* transzpozáz-transzpozon rendszert tartalmaz [39]. Doxycyclin hatására a transzaktivátor elindítja a hiperaktív *sleeping beauty* transzpozáz enzim (HSB) szintézisét, így az érintett sejtekben mobilizálja a transzpozont. A transzpozon (Tn) egy olyan DNS-szekvencia, amely a mobilizációját követően „ugrik”, vagyis kivágódik, majd véletlenszerűen – azaz minden sejtben más-más helyen – ismét beépül a genomba. Ez az inserciós hely az adott sejtben és minden leszármazottjában – a klonjaiban – stabil, tehát DNS-szekvenálással azonosítható. Így minden klónra egy egyedi genetikai jel (genetic tag) lesz a jellemző (6. ábra). (A „tag” stabilitásának feltétele természetesen az, hogy a doxycyclinnel történő indukció rövid ideig tartson, majd az antibiotikum hiányában leálljon a transzpozáz enzim szintézise és ezzel megszűnjön a transzpozíció. Ellenkező esetben a transzpozon folyamatosan tovább „ugrál” a genomban.) Mivel a rendszer doxycyclin adásával bármely életkorban bekapcsolható, lehetővé teszi az egyensúlyi vérképzés vizsgálatát anélkül, hogy őssejt-transzplantációra lenne szükség. Ezt kihasználva 8–10 hetes (fiatal felnőtt) transzgenikus egereket kezelték az antibiotikummal, majd egy hosszabb (13 hetes) szünet után 4–6 hetenként mintákat vettek az állatok véréből (7/A ábra). (Azokat a fehérvérsejteket, amelyekben megtörtént a



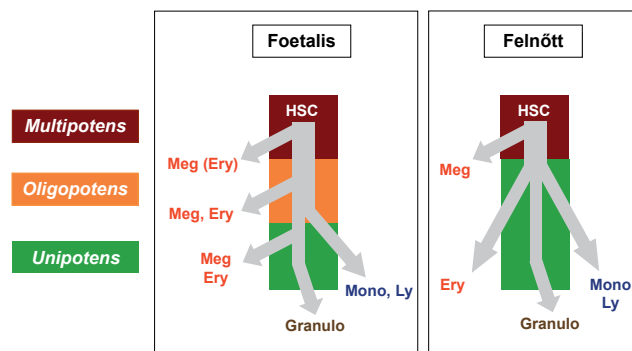
6. ábra | Az M2/HSB/Tn genotípusú hármastranzgenikus egér



7. ábra | A felnőttkori egyensúlyi vérképzésben elsősorban elkötelezett, unipotens elődsejtek vesznek részt

transzpozíció, áramlási citometria segítségével tudták izolálni a mintákból, ugyanis a transzgenikus konstrukció egy vörös fényben fluoreszkáló fehérje [DsRed, Discosoma {korall} vörös] génjét is tartalmazta, ami csak azokban a sejtekben fejeződik ki, amelyekben a transzpozon kimozdult eredeti pozíciójából.) A mintavételt a 39. hétig folytatták, majd a 40. héten feláldozták az állatokat, és csontvelői magvas sejteiket is izolálták. A különböző időpontokban vett mintákból származó granulocytákban (Gr), valamint T- és B-lymphocytákban – sejt szintű DNS-szekvenálással (scDNAseq) – azonosították a rájuk jellemző genetikai jelet, azaz a Tn „tag” inzerció helyét. Mint a 7/B ábra mutatja, a granulocyták döntő többsége olyan klónból származik, amely a vizsgálat során csak egyetlen időpontban tűnt fel, alig néhány granulocytá-„tag” jelenik meg ismételt mintákban. Ráadásul az ismételt megjelenések általában egymás utáni időpontokban történtek. Ugyancsak viszonylag ritka, hogy valamely granulocytá-„tag” egyidejűleg lymphocytákban is megjelenjen. A 2369, csak granulocytában azonosított „tag” mellett 51, 118 és 15 olyan genetikai jelet találtak, amelyek a granulocyták mellett T- vagy B-sejtekben, illetve T- és B-sejtekben is előfordulnak (7/C ábra). Az egyensúlyi vérképzés során keletkező granulocyták nagy része tehát olyan myeloid irányba elkötelezett klónból származik, amely a vizsgálat során egyetlenegyszer tűnik fel a vérben. Vagyis az erősen poliklonális granulopoiesis nagyszámú, hosszú életű, szukcesszíven, de csak rövid időre aktiválódó és akkor is viszonylag kevés érett sejtet létrehozó, majd eltűnő elődsejtklón működésén alapul. (Mivel a vérben található T- és B-sejtek jórészt hosszú életű memóriasejtek, a rendszer nem igazán alkalmas a perifériás lymphoid sejtek/klónok vizsgálatára.) Végül a csontvelőben található „klasszikus” LT-HSC-kben és a vérsejtekben előforduló genetikai jelek között fiatal és középkorú állatokban aligalig, idős (~2 éves) egerekben viszont már egyértelműen van átfedés. Mindezek alapján a szerzők feltételezik,

hogy a myeloablált recipiensekbe történő transzplantáció során azonosítható, tartós repopulációra képes vérképző őssejtek nem vagy legfeljebb minimális mértékben vesznek részt a felnőttkori egyensúlyi vérképzésben. Szereljük inkább az ontogenezis korai szakaszában, a vérképző rendszer kialakulásakor és idős korban (amikor az elődsejtkészlet fogyóban van?) jelentős [39]. Hasonló eredményre jutottak Busch és mtsai [40] egy másik, Cre-loxP alapú transzgenikus egeret alkalmazva, amelyben a Cre rekombinááz enzim génjét a Tie2 receptort (az LT-HSC-ken is kifejeződik, angiopoetin-1-kötő, tirozin-kináz-receptor) kódoló génhez kapcsolták. A tamoxifennel történő indukálhatóságot két módosított ösztrogénreceptor-domén biztosította, a riportter gén pedig két loxP-szekvencia közé ékelt – úgynevezett floxolt – sárga fluoescens fehérje (yellow fluorescent protein – YFP) volt (Tie2MCM egér). Megállapították, hogy az egyes Lin<sup>-</sup>c-Kit<sup>+</sup> Sca1<sup>+</sup>CD48<sup>-</sup>CD150<sup>+</sup>LT-HSC-k minimális szerepet játszanak/játszhatnak a tamoxifennel kezelt, felnőtt Tie2MCM egerek napi vérképzésében. A haematopoieticus sejtek differenciálódása során ugyanis a leglassabb lépés az LT-HSC/ST-HSC átmenet, ami akár egy évet is igénybe vehet. A sejtosztódás és -érés csak ez után gyorsul fel, így az egyensúlyi vérképzés elsősorban a hosszú életű elődsejtek és – részben – az ST-HSC-k működésén alapul. (A laboratóriumi egerek átlagos élettartama 2 év.) Hozzá kell tenni, hogy az őssejtek jelölésének hatékonysága a két kísérleti rendszerben igen különböző. Az M2-rtTA/HSB/Tn egerekben az LT-HSC-k ~30%-a, míg a Tie2MCM állatokban csak ~1%-uk jelölődik. Ez magyarázhatja az eredmények közötti kisebb eltéréseket. (Lásd például az ST-HSC-k szerepét az egyensúlyi vérképzésben!) Abban viszont teljes az egyetértés a két munkacsoport között, hogy őssejt-transzplantáció után egészen más jellegű vérképző rendszer alakul ki, mint fiziológias körülmények között. Utóbbi esetben – mint láttuk – az egyensúlyi haematopoiesis erősen poliklonális, az érett vérsejtek folyamatos termelését elsősorban különböző elkötelezettségű elődsejtklónok ezreinek az aktivitása biztosítja. HSC-transzplantáció után viszont a beavatkozást túlélő kevés őssejt-ből egy beszűkült, oligoklonális vérképző rendszer alakul



8. ábra | A myeloid-erythroid-megakaryocita irányú fejlődés változása az emberi egyedfejlődés során. A felnőttcsontvelőből hiányoznak az oligopotens elődsejtek



ki. (A graftban található LT-HSC-k legfeljebb 5–10%-a éli túl a transzplantációt, a többi HSC a különböző donoreredetű elődsejtekkel együtt 3–4 hónapon belül elpusztul [39, 40].)

Az egyes elődsejt-populációk részletes molekuláris genetikai vizsgálata további meglepetéseket hozott. *Paul és mtsai* [41] 6–8 hetes (fiatal felnőtt) egerekből 2730,  $Scal^{-}c\text{-Kit}^{+}Lin^{-}$  fenotípusú myeloid elődsejtet izoláltak – ez a sejtpopuláció elvben az összes CMP-t, MEP-et és GMP-t tartalmazza –, majd minden egyes sejtben megvizsgálták 3461 különböző gén expresszióját (scRNAseq, scChiPseq). A transzkripciós profilok összehasonlítása során (klaszterezés, számítógépes modellezés) 7 különböző – erythrocyta, megakaryocita, monocyta, dendritikus sejt, neutrophil, basophil és eosinophil granulocyta – fejlődési irányba történő differenciálódásra felkészült, illetve részben elkötelezett sejtcsoportot tudtak megkülönböztetni. Később e 7 sejtcsoport létezését *in vitro* kolóniatesztek és *in vivo* kísérletek is megerősítették. Hasonló eredmények születtek, amikor ugyancsak felnőtt egér csontvelőjéből származó CMP-eket ( $Scal^{-}c\text{-Kit}^{+}CD16/32^{low}CD34^{+}$  sejtek) – Lentivírus vektor segítségével – DNS-vonalkóddal és zöld fluoreszcens fehérjével (green fluorescent protein – GFP) jelöltek, majd a zölden világító sejteket visszaoltották állatokba. Később izolálták és a vonalkód alapján azonosították az egyes CMP-kból származó myeloid ( $GFP^{+}CD11b^{+}$ ) és erythroid ( $GFP^{+}Ter119^{+}$ ) sejteket. Kiderült, hogy alig-alig fordult elő olyan „CMP”, amiből myeloid és erythroid sejt is keletkezett volna [42]. Mindezek alapján egyértelművé vált, hogy a haematopoesis során nagyon hamar – már valahol a multipotens kompartmentben (HSC – MPP?) – bekövetkezik a különböző sejtfejlődési sorok irányába történő felkészülés és elköteleződés. A felnőttkori vérképző rendszerben nincsenek – legfeljebb minimális arányban – olyan oligopotens elődsejtek, mint a CMP-k, GMP-k vagy MEP-ek, illetve, ha léteznek is ilyen fejlődési stádiumok, akkor azok nagyon átmenetiek. Nehéz olyan oligopotens elődsejtet találni, amikben párhuzamosan több sejtfejlődési sor kialakításában szerepet játszó TF-ek egyidejűleg expresszálódnak. Ami technikai szempontból a legfontosabb, hogy a sejtfelszíni markerek analízisének alapuló sejtpopuláció/szubpopuláció azonosítás(ok) nem tükrözi(k) a vérképző rendszer tényleges struktúráját [41, 42].

Emberekben természetesen nem lehetséges jelölt vérképző sejtek sorsának *in situ* követése – illetve csak génterápiás beavatkozás utáni HSC-transzplantáció esetén van erre lehetőség [43]. Bizonyos génextpressziós és egyes funkcionális vizsgálatok azért mégiscsak elvégezhetőek. Ezt tették *Notta és mtsai* [44], akik különböző sejtfelszíni markerkombinációk alapján, áramlási citometria segítségével 11-11, különböző haematopoieticus őss- és elődsejtfrakciót izoláltak foetalis májból, köldökzsinórvérből és felnőttcsontvelőből. A következő lépésben minden frakcióból körülbelül három-háromezer egyedi sejt génextpressziós profilját, *in vitro* kolóniakép-

zését és – immundeficiens (NOD-*Scid-IL-2R $\gamma$ <sup>null</sup>*) egerekbe oltva – *in vivo* repopulációs, valamint differenciálódási képességét határozták meg. Legfontosabb eredményük, hogy a foetalis májban a multipotens vérképző sejtek mellett nagyszámú – granulocyta, megakaryocyta és erythrocyta irányba egyaránt differenciálódni képes – oligopotens elődsejt is előfordul. A felnőttcsontvelőből viszont szinte teljesen hiányoznak ezek az oligopotens – a „klasszikus” CMP-knek és MEP-eknek megfelelő – elődsejtek. Az áramlási citometria során izolált CMP- és MEP-frakciók valójában különböző unipotens elődsejtek keverékéből állnak. A felnőttcsontvelőben tehát a granulocyták és az erythrocyták ilyen unipotens elődsejtekből fejlődnek. Kivételt képezhetnek a megakaryocyták, amiknek eredete valószínűleg közvetlenül a multipotens (HSC) kompartmenthez köthető (8. ábra). Utóbbi összhangban van azokkal a korábbi, egérben kapott eredményekkel, miszerint a HSC-k egy része vWF-pozitív [11, 30], és stresszhelyzetben valószínűleg ezekből a sejtekből keletkezik rövid idő alatt nagyszámú megakaryocyta [45, 46]. Összegzőként tehát elmondhatjuk, hogy a felnőttkori egyensúlyi és a HSC-transzplantáció után kialakuló regeneratív vérképzés mechanizmusa mind egérben, mind emberben eltérő. Előbbi erősen poliklonális, és folyamatos működése elsősorban elkötelezett – jobbra unipotens – elődsejteken alapul, míg a HSC-transzplantált recipiensokban – viszonylag kevés őssejt közreműködésével – döntően oligoklonális vérképzés alakul ki. Ezek alapján természetesen újra kell gondolni a HSC-k öregedésének mechanizmusát is [37, 47], különös tekintettel az időskorban kialakuló oligoklonális vérképzésre [48, 49]. Ráadásul az őssejtek citokinindukált mobilizációja vagy egyes vérsejtfejlődési sorok depléciója után multi- és oligopotens elődsejt-aktivitás figyelhető meg anélkül, hogy a HSC-k proliferációja számottevően fokozódna [50], vagyis az elődsejtek unipotenciája valószínűleg csak homeosztázisban igaz [42]. Ugyanakkor az 5-fluorouracillal kezelt felnőtt egerek csontvelőjében az LT-HSC-k is aktívan részt vesznek a regenerációban [40]. Így akár háromféle – egyensúlyi, stresszhelyzetet kísérő és regenerációs (citosztatikus kezelés, illetve őssejt-transzplantáció utáni) – felnőttkori vérképzésről is beszélhetünk. A rendszer tehát robusztus, azaz hibatűrő képessége (angolul *robustness*) [51] rendkívül magas, és ennek megfelelően igen szélsőséges behatásokra is képes rugalmasan – működőképességét megőrizve – válaszolni. Tisztázatlan viszont, hogy mikor és hogyan jönnek létre a felnőttkori egyensúlyi vérképzésben domináló unipotens elődsejtek. Az egyik elképzelés szerint kialakulásuk már az ontogenezis korai fázisában (egerekben a születés utáni 3. hét végére) befejeződik, és ez az elődsejtkészlet időskorig elegendő a homeosztatikussal vérképzés fenntartására [39]. A másik feltételezés szerint viszont – amit többek között *Busch és mtsai* [40] javasoltak – a „nyugvónak” tartott LT-HSC-k rendkívül ritka, 100–150 naponként bekövetkező, részben aszimmetrikus osztódása is elegendő ahhoz, hogy

annyi ST-HSC keletkezzen, amelyeknek a leánysejtjei – legalábbis egyensúlyi állapotban – elegendők az elődsejt-készlet folyamatos pótlásához. Ez különösen a mi, az egerekénél jóval hosszabb életünk során lehet fontos, hiszen esetünkben nehéz elképzelni egy időskorunkig elegendő elődsejt-készlet felhalmozódását a csecsemőkori csontvelőben.

## Merre tovább?

Kérdés, hogy ezek a sokszor meglepő, új eredmények, amelyek alapvetően megváltoztatták a vérképző rendszer felépítéséről és működéséről alkotott elképzeléseinket, mikor és milyen mértékben hasznosulnak (hasznosulhatnak) a klinikai gyakorlatban? Bár még korai lenne konkrét válaszokat keresni, a hematológia több területén számíthatunk jelentős előrelépésre. Egyrészt a leukaemiák és lymphomák patomechanizmusa kapcsán ki kell emelnünk, hogy a HSC-k leánysejtjeinek korai elköteleződése – az oligopotens elődsejt színtel teljes hiánya az egyensúlyi vérképzés során – talán közelebb visz bennünket annak megértéséhez, hogy miért olyan ritkák a több vérsajtfejlődési sort érintő neoplasztikus elváltozások. Ráadásul az egyes – elsősorban myeloid – elődsejt-populációk hosszú élettartama és – legalábbis részleges önfenntartó képessége – arra utal, hogy ezek a sejtek sokkal könnyebben transzformálódhatnak, mint korábban gondoltuk. Azaz viszonylag kevés genetikai változás szükséges ahhoz, hogy teljesen önfenntartó, „tumör-össejt”-klónokká alakuljanak. A neoplasztikus klónok eredetét tehát nem feltétlenül kell egészen a HSC-kig visszavezetni, egy részük elődsejt-eredetű is lehet. Ugyanakkor a különböző HSC-altípusok ( $\alpha$ ,  $\beta$  és  $\gamma/\delta$  sejtek) arányának az egyedfejlődés során bekövetkező változása szintén összefüggésbe hozható azzal, hogy fiatal gyermekkorban inkább a lymphoid, míg az öregedő páciensekben inkább a myeloid eredetű vérképző rendszeri tumorerő dominálnak.

A haematopoeticus őssejt-transzplantációk kapcsán pedig az merülhet fel, hogy a különböző HSC-altípusok – a recipiens betegségétől függően – esetleg eltérő módon, illetve arányban alkalmazhatók az eljárás során. Myelopeniás betegeket például elsősorban  $\alpha$ -HSC-ekkel lenne célszerű traszplantálni, így talán a *graft versus host betegség* kockázatát is sikerülne csökkenteni. A lymphopeniákat vagy az időskori immunhiányt viszont elég lehet  $\gamma/\delta$ -HSC-k segítségével korrigálni. Ráadásul a különböző HSC-altípusok szelektív alkalmazása lehetővé tenné a traszplantációt megelőző előkészítő kezelés intenzitásának csökkentését, vagyis nem minden esetben lenne szükség teljes myeloablációra, ami nagyban csökkentené a beavatkozással járó kockázatot (ka)t. Természetesen az új kutatási eredmények számos további potenciális diagnosztikai és/vagy terápiási alkalmazási lehetősége is felmerül, de csak a jövő fogja eldönteni, hogy ezek közül melyek lesznek azok, amelyek ténylegesen hasznosításra kerülnek (kerülhetnek) a gyógyítómunkában.

*Anyagi támogatás:* A cikk megírása anyagi támogatásban nem részesült.

*Szerzői munkamegosztás:* M. Zs.: Anyaggyűjtés (irodalmazás), az ábrák anyagának összeállítás, a kézirat megfogalmazása. K. Gy.: Anyaggyűjtés (irodalmazás), a kézirat megfogalmazása. U. S. V.: Témavezetés, a kézirat végső formába öntése. U. F.: Témavezetés, az ábrák és a kézirat végső formába öntése. A szerzők a cikk végleges változatát elolvasták és jóváhagyták.

*Érdekltségek:* A szerzőknek nincsenek érdekltségeik.

## Irodalom

- [1] Eaves, C. J.: Hematopoietic stem cells: concepts, definitions, and the new reality. *Blood*, 2015, 125(17), 2605–2613.
- [2] Höfer, T., Busch, K., Klapproth, K., et al.: Fate mapping and quantitation of hematopoiesis in vivo. *Annu. Rev. Immunol.*, 2016, 34, 449–478.
- [3] Kondo, M., Wagers, A. J., Manz, M. G., et al.: Biology of hematopoietic stem cells and progenitors: implications for clinical application. *Annu. Rev. Immunol.*, 2003, 21, 759–806.
- [4] Bryder, D., Rossi, D. J., Weissman, I. L.: Hematopoietic stem cells: the paradigmatic tissue-specific stem cell. *Am. J. Pathol.*, 2006, 169(2), 338–346.
- [5] Hu, M., Krause, D., Greaves, M., et al.: Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev.*, 1997, 11(6), 774–785.
- [6] Laslo, P., Pongubala, J. M., Lancki, D. W. et al.: Gene regulatory networks directing myeloid and lymphoid cell fates within the immune system. *Semin. Immunol.*, 2008, 20(4), 228–235.
- [7] Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., et al.: Identification of Flt3<sup>+</sup> lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential. A revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell*, 2005, 121(2), 295–306.
- [8] Månsson, R., Hultquist, A., Luc, S., et al.: Molecular evidence for hierarchical transcriptional lineage priming in fetal and adult stem cells and multipotent progenitors. *Immunity*, 2007, 26(4), 407–419.
- [9] Guo, G., Luc, S., Marco, E., et al.: Mapping cellular hierarchy by single-cell analysis of the cell surface repertoire. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(4), 492–505.
- [10] Yamamoto, R., Morita, Y., Oebara, J., et al.: Clonal analysis unveils self-renewing lineage-restricted progenitors generated directly from hematopoietic stem cells. *Cell*, 2013, 154(5), 1112–1126.
- [11] Sanjuan-Pla, A., Macaulay, I. C., Jensen, C. T., et al.: Platelet-biased stem cells reside at the apex of the haematopoietic stem-cell hierarchy. *Nature*, 2013, 502(7470), 232–236.
- [12] Eitzrodt, M., Endeke, M., Schroeder, T.: Quantitative single-cell approaches to stem cell research. *Cell Stem Cell*, 2014, 15(5), 546–558.
- [13] Macaulay, I. C., Voet, T.: Single cell genomics: advances and future perspectives. *PLoS Genet.*, 2014, 10(1), e1004126.
- [14] Naik, S. H., Schumacher, T. N., Perie, L.: Cellular barcoding: a technical appraisal. *Exp. Hematol.*, 2014, 42(8), 598–608.
- [15] Hsu, Y. C.: Theory and practice of lineage tracing. *Stem Cells*, 2015, 33(11), 3197–3204.
- [16] Muller-Sieburg, C. E., Cho, R. H., Karlsson, L., et al.: Myeloid-biased hematopoietic stem cells have extensive self-renewal capacity but generate diminished lymphoid progeny with impaired IL-7 responsiveness. *Blood*, 2004, 103(11), 4111–4118.
- [17] Sieburg, H. B., Cho, R. H., Dykstra, B., et al.: The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood*, 2006, 107(6), 2311–2316.

- [18] Dykstra, B., Kent, D., Bowie, M., et al.: Long-term propagation of distinct hematopoietic differentiation programs in vivo. *Cell Stem Cell*, 2007, 1(2), 218–229.
- [19] Benz, C., Copley, M. R., Kent, D. G., et al.: Hematopoietic stem cell subtypes expand differentially during development and display distinct lymphopoietic programs. *Cell Stem Cell*, 2012, 10(3), 273–283.
- [20] Challen, G. A., Boles, N. C., Chambers, S. M., et al.: Distinct hematopoietic stem cell subtypes are differentially regulated by TGF- $\beta$ . *Cell Stem Cell*, 2010, 6(3), 265–278.
- [21] Morita, Y., Ema, H., Nakauchi, H.: Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J. Exp. Med.*, 2010, 207(6), 1173–1182.
- [22] Oguro, H., Ding, L., Morrison, S. J.: SLAM family markers resolve functionally distinct subpopulations of hematopoietic stem cells and multipotent progenitors. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(1), 102–116.
- [23] Shin, J. Y., Hu, W., Naramura, M., et al.: High c-Kit expression identifies hematopoietic stem cells with impaired self-renewal and megakaryocytic bias. *J. Exp. Med.*, 2014, 211(2), 217–231.
- [24] Sakamoto, H., Takeda, N., Arai, F., et al.: Determining c-Myb protein levels can isolate functional hematopoietic stem cell subtypes. *Stem Cells*, 2015, 33(2), 479–490.
- [25] Anjos-Afonso, F., Currie, E., Palmer, H. G., et al.: CD34<sup>+</sup> cells at the apex of the human hematopoietic stem cell hierarchy have distinctive cellular and molecular signatures. *Cell Stem Cell*, 2013, 13(2), 161–174.
- [26] Sieburg, H. B., Reznier, B. D., Muller-Sieburg, C. E.: Predicting clonal self-renewal and extinction of hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108(11), 4370–4375.
- [27] Lu, R., Neff, N. F., Quake, S. R., et al.: Tracking single hematopoietic stem cells *in vivo* using high-throughput sequencing in conjunction with viral genetic barcoding. *Nat. Biotechnol.*, 2011, 29(10), 928–933.
- [28] Verovskaya, E., Broekhuis, M. J., Zwart, E., et al.: Heterogeneity of young and aged murine hematopoietic stem cells revealed by quantitative clonal analysis using cellular barcoding. *Blood*, 2013, 122(4), 523–532.
- [29] Kent, D. G., Dykstra, B. J., Cheyne, J., et al.: Steel factor coordinately regulates the molecular signature and biologic function of hematopoietic stem cells. *Blood*, 2008, 112(3), 560–567.
- [30] Wilson, N. K., Kent, D. G., Buettner, F., et al.: Combined single-cell functional and gene expression analysis resolves heterogeneity within stem cell populations. *Cell Stem Cell*, 2015, 16(6), 712–724.
- [31] Novershtern, N., Subramanian, A., Lawton, L. N., et al.: Densely interconnected transcriptional circuits control cell states in human hematopoiesis. *Cell*, 2011, 144(2), 296–309.
- [32] Gekas, C., Graf, T.: CD41 expression marks myeloid-biased adult hematopoietic stem cells and increases with age. *Blood*, 2013, 121(22), 4463–4472.
- [33] Pang, W. W., Price, E. A., Saboo, D., et al.: Human bone marrow hematopoietic stem cells are increased in frequency and myeloid-biased with age. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2011, 108(50), 20012–20017.
- [34] Sigurdsson, V., Takei, H., Soboleva, S., et al.: Bile acids protect expanding hematopoietic stem cells from unfolded protein stress in fetal liver. *Cell Stem Cell*, 2016, 18(4), 522–532.
- [35] Bowie, M. B., McKnight, K. D., Kent, D. G., et al.: Hematopoietic stem cells proliferate until after birth and show a reversible phase-specific engraftment defect. *J. Clin. Invest.*, 2006, 116(10), 2808–2816.
- [36] Qiu, J., Papatsenko, D., Niu, X., et al.: Divisional history and hematopoietic stem cell function during homeostasis. *Stem Cell Reports*, 2014, 2(4), 473–490.
- [37] Dykstra, B., Olthoff, S., Schreuder, J., et al.: Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.*, 2011, 208(13), 2691–2703.
- [38] Yu, V. W., Scadden, D. T.: Heterogeneity of the bone marrow niche. *Curr. Opin. Hematol.*, 2016, 23(4), 331–338.
- [39] Sun, J., Ramos, A., Chapman, B., et al.: Clonal dynamics of native haematopoiesis. *Nature*, 2014, 514(7522), 322–327.
- [40] Busch, K., Klapproth, K., Barile, M., et al.: Fundamental properties of unperturbed haematopoiesis from stem cells *in vivo*. *Nature*, 2015, 518(7540), 542–546.
- [41] Paul, F., Arkin, Y., Giladi, A., et al.: Transcriptional heterogeneity and lineage commitment in myeloid progenitors. *Cell*, 2015, 163(7), 1663–1677.
- [42] Perié, L., Duffy, K. R., Kok, L., et al.: The branching point in erythro-myeloid differentiation. *Cell*, 2015, 163(7), 1655–1662.
- [43] Biasco, L., Pellin, D., Scala, S., et al.: *In vivo* tracking of human hematopoiesis reveals patterns of clonal dynamics during early and steady-state reconstitution phases. *Cell Stem Cell*, 2016, 19(1), 107–119.
- [44] Notta, F., Zandi, S., Takayama, N., et al.: Distinct routes of lineage development reshape the human blood hierarchy across ontogeny. *Science*, 2016, 351(6269), aab2116.
- [45] Haas, S., Hansson, J., Klimmeck, D., et al.: Inflammation-induced emergency megakaryopoiesis driven by hematopoietic stem cell-like megakaryocyte progenitors. *Cell Stem Cell*, 2015, 17(4), 422–434.
- [46] Roch, A., Trachsel, V., Lutolf, M. P.: Brief report: Single-cell analysis reveals cell division-independent emergence of megakaryocytes from phenotypic hematopoietic stem cells. *Stem Cells*, 2015, 33(10), 3152–3157.
- [47] Jung, J., Buisman, S., de Haan, G.: Hematopoiesis during development, aging and disease. *Exp. Hematol.*, 2016, 44(8), 689–695.
- [48] Genovese, G., Köhler, A. K., Handsaker, R. E., et al.: Clonal hematopoiesis and blood-cancer risk inferred from blood DNA sequence. *N. Engl. J. Med.*, 2014, 371(26), 2477–2487.
- [49] Holstege, H., Pfeiffer, W., Sie, D., et al.: Somatic mutations found in the healthy blood compartment of a 115-yr-old woman demonstrate oligoclonal hematopoiesis. *Genome Res.*, 2014, 24(5), 733–742.
- [50] Säwén, P., Lang, S., Mandal, P., et al.: Mitotic history reveals distinct stem cell populations and their contributions to hematopoiesis. *Cell Rep.*, 2016, 14(12), 2809–2818.
- [51] Kitano, H.: Biological robustness. *Nat. Rev. Genet.*, 2004, 5(11), 826–837.

(Uher Ferenc dr.,  
Budapest, Karolina út 19–21., 1113  
e-mail: uher.ferenc@gmail.com)