

Válasz Dr. Dinnyés András bírálataira

Nagyon köszönöm Dinnyés Andrásnak, hogy elvállalta dolgozatom bírálatát. Örömmel vettem elismerő szavait és javító szándékú megjegyzéseit.

Kritikai megjegyzésre és kérdéseire válaszaim a következők:

Kritikai Megjegyzés a 36. Ábra kapcsán: a porc festésnél a bmMSC kevésbé mutat rózsaszín proteoglikán festődést mint a másik két fotó, véleményem szerint nem meggyőző az eltérés a fibroblaszthoz képest

Valóban a fotó nem a legszerencsésebb, mivel azonban az MSCL-2 sejtek differenciációs képességét szerettük volna megmutatni és az jól látszik, ez az eredmények értelmezésében nem okozott problémát.

Megjegyzés az 5. sorszámú új eredmények kapcsán: „A pluripotens őssejteken több olyan receptor liganddal is kalcium jelet lehet előidézni, amelyek az eukariótákban konzerváltak...”, Sajnos nem világos a mondat alapján, mi pontosan az új eredmény.. („érdemes a technikát megválasztani”)

Köszönöm az észrevételt, ezt a mondatot érdemes lett volna pontosabban fogalmazni. Mivel a humán pluripotens őssejtek kalcium-szignalizációjáról nem volt még adat, az hogy milyen ligandokra és milyen lefutású jeleket mutatnak, véleményem szerint új eredménynek számít. Ezenfelül a mérés technika kidolgozása (dajkasejtek kizárása, GCaMP2 indikátor használata) szintén újdonságnak számított abban az időben, amikor a cikk íródott.

A következő kérdéseket teszem fel a jelöltnek:

Kérdés 1-2: Az ABCG2-R482G potenciális védőhatás vizsgálata eredményes volt a doxorubicin (DOX) ellen.

- milyen gyakorlati hasznosítása lehet a toxikus anyagokkal szemben védett génmódosított szívsejteknek?

A génmódosítás védelmet nyújthat a terápiás sejteknek, a szívkárosító hatásokkal/kezelésekkel szemben ellenállóbbá teheti őket. Így a beépült sejtek javíthatják a szív funkcióját és megelőzhetik súlyosabb szövődmények kialakulását. Ugyanakkor ez a kísérlet arra is rámutat, hogy a kemoterápiás kezelések idején a szívizomban átmenetileg megemelt ABCG2 (nem beépülő vektorokkal pl.) megvédheti a szív sejtjeit a károsodástól.

- a szükséges génterápiás eljárásoknak milyen esetleges mellékhatásai lehetnek?

Ez a kérdés nagyon széleskörű, részletes megválaszolása meghaladja a doktori védés kereteit. Röviden összefoglalva a génterápiás eljárások mindegyikének vannak mellékhatásai, ami magából a génbeviteli technikából adódik. Például, gyakorlatilag az összes génbeviteli technika okozhat immunológiai problémákat (gyulladás, allergiás

reakció, máj toxicitás), a beépülő vektorok mutációkat okozhatnak, ami a sejtek transzformációjához és rák kialakulásához vezethetnek. Ebben a konkrét esetben az ABCG2 bevitelle szívizomsejtekbe viszonylag kis kockázatú lenne, mivel a szívizom tumoros elváltozásának az esélye igen kicsi. Transzpozonos génbeviteli eljárást is használnak több klinikai kipróbálásban is, egyelőre kevés mellékhatást tapasztaltak. Természetesen a génmódosított sejtekkel való terápiás eljárásoknak, a sejterápia szempontjából, is megvannak a maga buktatói. Így a terápiásan beépített sejtekkel szemben szintén kialakulhat immunválasz, gyulladás, kilökődés, funkcionális problémák stb.

Kérdés 3-6:

- A hESC-ből spontán differenciációval létrejött MSC1-2 klón mennyiben felelt meg egy sejtvonal kritériumoknak?

Nem könnyű válaszolni a kérdésre, mivel a sejtvonal definíciója nem egyértelmű, függhet az élettartamtól (finite/infinite) vagy a klonalitás meglététől, illetve a funkció/fenotípus megőrzésétől is (Verma et al. 2020).

Amennyiben elfogadjuk az alábbi definíciót;

„Cell line is a general term that applies to a defined population of cells that can be maintained in culture for an extended period of time, retaining stability of certain phenotypes and functions.“ (Z. Li, in Comprehensive Biotechnology (Second Edition), 2011), akkor minden tekintetben megfelel a kritériumoknak, mivel „hosszú távon (30 passzázsig), fenotípusos vagy funkcionális változások nélkül szaporíthatók és fenntarthatók *in vitro* tenyésztésben”. A cikk megjelenése óta többször is használtuk az MSC1-2 sejteket és azóta is megbízhatóan szaporíthatók és differenciálódnak csont és zsír irányba.

- A „Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells” (The International Society for Cellular Therapy position statement) által megadott néhány kritérium alapján mennyiben feleltethetőek meg ezen sejtek egy szervezetben előforduló valódi MSC sejt populációnak?

A 2006-ban megfogalmazott minimum feltételek:

“MSC must be **plastic-adherent** when maintained in standard culture conditions. Second, MSC must **express CD105, CD73 and CD90**, and **lack expression of CD45, CD34, CD14 or CD11b, CD79alpha or CD19 and HLA-DR** surface molecules. Third, MSC **must differentiate to osteoblasts, adipocytes and chondroblasts in vitro.**” alapján ezek a sejtek is “valódi” MSC populációnak felelnek meg. A szervezetben előforduló MSC populációk azonban nagyon különbözőek a 1) szöveti forrástól, amiből a sejteket izolálták (pl. csontvelő, zsírszövet, köldökzsinór stb.), 2) a donor korától (nemétől) függően is (Jones et al. 2015, Ackema et al. 2008, Sági et al. 2012). További variációt okoz a szeparálási mód és az *in vitro* tenyésztési körülmények is (a vizsgálatok egy részében a primer sejtek jellemzése rövidebb-hosszabb tenyésztés után történik). Ezért azt, hogy pontosan megfeleltethetők-e az MSC1-2 sejtek egy adott szervben jelenlévő MSC populációnak, azt az adataink alapján nem lehet eldönteni. Ehhez további, sokkal szélesebb körű marker és funkcionális vizsgálatokra lenne szükség.

- a HUES9-eredetű MSC1-2 és a felnőtt bmMSC-sejtek fenotípusos hasonlóságot mutattak, de ha a HUES9 sejtek immunszuppressziós vizsgálatát elvégezték volna, nem mutatott volna a pluripotens őssejt is hasonló immunszuppressziót?

Mi nem végeztünk ilyen kísérleteket és az irodalomban sem találtam olyan példát, ahol a humán embrionális őssejteket és a belőlük differenciált MSC-eket hasonlították volna össze *in vitro*. A kérdés elméletileg érdekes, de terápiás szempontból nem gondolom, hogy bárki pluripotens sejtekkel próbálna immunszuppressziót elérni.

Azt állatkísérletekből tudjuk, hogy bár a pluripotens őssejtek nem túl immunogének, de a természetes ölüssejteket (NK) illetve kisebb mértékben a citotoxikus limfocitákat is

aktiválják (Dessler et al. 2009 és 2011, Zhao 2014) és így végül az allogén graft kilökődését okozzák. Terápiás szempontból ezért is törekednek arra, hogy valamilyen módon hipo-immunogénné (Lanza et al., 2019, Wang et al., 2022.) tegyék az allogén pluripotens őssejteket, illetve származékaikat, ezzel létrehozva univerzálisan használható terápiás sejteket. A hipo-immunogén sejteket a módosítatlan szülői sejtekhez hasonlítva *in vitro* és *in vivo* tesztekben is azt találták, hogy a módosított sejtek gátolták az aktivált immunsejteket a módosítatlan szülői sejtekhez képest (Zhao et al. 2014, Harding et al. 2023). Meg kell jegyezni azonban, hogy a kísérletek nem tisztán a pluripotens őssejtekről nyújtanak információt, mivel az *in vivo* tesztekben teratoma méretet mérnek, ami 10. nap után kezd növekedni, ekkor már a sejtek nagy része differenciálódott és csak kevés pluripotens sejt van jelen. Az *in vitro* esetekben aktivált limfocitákat/ kevert limfocita kultúrákat használnak, és 5 napig tartják együtt az őssejtekkel, ami szintén felveti azt a lehetőséget, hogy az őssejtek részben differenciálódnak és a hatások egy részét ezek a differenciálódott sejtek okozzák.

- Mennyire volt homogén az MSC1-2 populáció? Történt-e bármilyen single cell vizsgálat (omics?) amely segíthetné ennek megválaszolását, ami a dolgozatban említett lehetséges terápiás alkalmazásoknál az engedélyező hatóságok által elvárás lehet?

A sejtek a morfológia és a felszíni marker expresszió alapján (4. táblázat) homogénnek mutatkoztak. Amikor ezeket a sejteket izoláltuk, még nem álltak rendelkezésre az említett technológiák, azóta pedig az érdeklődésünk a betegségmodellezés felé fordult és ebből a szempontból nem vizsgáltuk tovább ezeket a sejteket. Amennyiben az extracelluláris vezikulákkal kapcsolatos eredményeink ígéretesnek mutatkoznak terápiás szempontból, megfontolandó ilyen vizsgálatok elvégzése is.

Kérdés 7-9: A Frank Ter Haar szindróma SH3PXD2b – KO modellben az előállított MSC-ben a MSC differenciáció lassulására, és ennek alapján feltételezhetően csontfejlődési elváltozásokra találtak fenotípusos kapcsolatokat.

- A szindrómára jellemző egyéb betegség fenotípusokat szintén sikerült igazolni a KO modellel?

Egyelőre nem történtek ilyen vizsgálatok.


- Vizsgálták-e például a KO sejtek cardiomyocita differenciációját, tekintettel a szindróma szívfejlődési rendellenesség fenotípusára?

Tervezzük elsősorban a neural crest sejtek vizsgálatát, mivel ezek nemcsak a betegeken kifejezett megjelenő arc diszmorfia, de szívfejlődési rendellenességek kialakulásában is fontos szerepet játszanak (ezenkívül jól működő differenciációs protokoll áll rendelkezésünkre Szabó Kornélia és munkatársai jóvoltából). Később szívizom irányú vizsgálatok is elképzelhetőek.

- Vizsgálták-e off-target génedítelési események jelenlétét a különböző klónokban? Ha igen, milyen módszerrel? Ezeknek lehet-e a modellben nem betegség specifikus fenotípusos hatása?

Az off-target hatásokat nem vizsgáltuk ebben az esetben, de valóban a további kísérletek esetében szükséges lesz elvégezni. Ilyenkor úgy járunk el, hogy a legmagasabb valószínűséggel előforduló off-target helyeket szekvenálással ellenőrizzük. Az, hogy több klón esetében is ugyanazt a fenotípusos eltérést tapasztaltuk, kevésbé teszi valószínűvé a nem betegség specifikus fenotípus hatást, azonban erről csak akkor lehet biztosan nyilatkozni, ha látnánk, hogy van-e és milyen genomi helyeken változás, a vad típusához képest.

Budapest, 2024. 02. 15.


Apáti Ágota Ph.D.

Irodalomjegyzék:

Verma A, Verma M, Singh A. Animal tissue culture principles and applications. *Animal Biotechnology*. 2020;269-93. doi: 10.1016/B978-0-12-811710-1.00012-4. Epub 2020 Jun 26. PMID: PMC7325846.

Z. Li, 5.43 - In *Vitro Micro-Tissue and -Organ Models for Toxicity Testing*, Editor(s): Murray Moo-Young, *Comprehensive Biotechnology (Second Edition)*, Academic Press, 2011, Pages 551-563, ISBN 9780080885049, <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-088504-9.00503-1>.

Jones E, Schäfer R. Where is the common ground between bone marrow mesenchymal stem/stromal cells from different donors and species? *Stem Cell Res Ther*. 2015 Aug 18;6(1):143. doi: 10.1186/s13287-015-0144-8. PMID: 26282627; PMID: PMC4539918.

Ackema KB, Charité J. Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev*. 2008 Oct;17(5):979-91. doi: 10.1089/scd.2007.0220. PMID: 18533811.

Sági B, Maraghechi P, Urbán VS, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Németh K, Monostori E, Gócsa E, Uher F. Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev*. 2012 Mar 20;21(5):814-28. doi: 10.1089/scd.2011.0551. Epub 2012 Jan 17. PMID: 22149974.

Dressel R, Guan K, Nolte J, Elsner L, Monecke S, Nayernia K, Hasenfuss G, Engel W. Multipotent adult germline stem cells, like other pluripotent stem cells, can be killed by cytotoxic T lymphocytes despite low expression of major histocompatibility complex class I molecules. *Biol Direct*. 2009 Aug 28;4:31. doi: 10.1186/1745-6150-4-31. PMID: 19715575; PMID: PMC2745366.

Dressel R. Effects of histocompatibility and host immune responses on the tumorigenicity of pluripotent stem cells. *Semin Immunopathol*. 2011 Nov;33(6):573-91. doi: 10.1007/s00281-011-0266-8. Epub 2011 Apr 4. PMID: 21461989; PMID: PMC3204002.

Zhao L, Teklemariam T, Hantash BM. Heterologous expression of mutated HLA-G decreases immunogenicity of human embryonic stem cells and their epidermal derivatives. *Stem Cell Res*. 2014 Sep;13(2):342-54. doi: 10.1016/j.scr.2014.08.004. Epub 2014 Aug 19. PMID: 25218797.

Lanza R, Russell DW, Nagy A. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat Rev Immunol*. 2019 Dec;19(12):723-733. doi:10.1038/s41577-019-0200-1. Epub 2019 Aug 15. PMID: 31417198.

Guangwen Wang, Pierre Heimendinger, R. Andrew Ramelmeier, Wenshi Wang, Pluripotent stem cell-based cell therapies: Current applications and future prospects, *Current Opinion in Biomedical Engineering*, Volume 22, 2022, 100390, ISSN 2468-4511, <https://doi.org/10.1016/j.cobme.2022.100390>.

Longmei Zhao, Takele Teklemariam, Basil M. Hantash, Heterologous expression of mutated HLA-G decreases immunogenicity of human embryonic stem cells and their epidermal derivatives, *Stem Cell Research*, Volume 13, Issue 2, 2014, Pages 342-354, ISSN 1873-5061, <https://doi.org/10.1016/j.scr.2014.08.004>.

Harding J, Vintersten-Nagy K, Yang H, Tang JK, Shutova M, Jong ED, Lee JH, Massumi M, Oussenko T, Izadifar Z, Zhang P, Rogers IM, Wheeler MB, Lye SJ, Sung HK, Li C, Izadifar M, Nagy A. Immune-privileged tissues formed from immunologically cloaked mouse embryonic stem cells survive long term in allogeneic hosts. *Nat Biomed Eng*. 2023 Nov 23. doi: 10.1038/s41551-023-01133-y. Epub ahead of print. PMID: 37996616.