

MTA doktori értekezés

**A nagy (őssejt)kaland; pluripotens őssejtvonalak létrehozása, jellemzése
és felhasználási lehetőségeik**

Apáti Ágota



Enzimológiai Intézet, TTK, ELKH

Budapest

2023

Ap[^]i ti.[^] gota_55_23

AJÁNLÁS

Balázsnak,
mentoraimnak,
kollégáimnak, barátaimnak és szeretteimnek,
egyszóval, Nektek*¹!

¹Ha mindannyiótok nevét kiírtam volna, hosszabb lenne a felsorolás, mint a dolgozat!

„Dömdödöm, dömdödöm,
dömdö-dömdö-dömdödöm

.....

- Miért, mit jelent?
- Azt, hogy mindannyiunkat nagyon szeret.
- Engem is? – kérdezte gyanakodva Bruckner Szigfrid.
- Persze, téged név szerint is megemlített.”

Lázár Ervin: A Négyszögletű Kerek Erdő

ELŐSZÓ

Kedves Olvasó!

Ez egy rendhagyó dolgozat*². De rendhagyó az idő, amikor születik; rendhagyó a téma, mert ez nemcsak tudományos értekezés, hanem beszámoló is életem legnagyobb szakmai kalandjáról. Az idő, amikor ezt a dolgozatot elkezdtem írni, 2020 tavasza, a koronavírus járvány*³ karantén időszaka volt, amikor legtöbbszörnek elég ideje volt szembenézni önmagával és feltenni a nagy kérdéseket*⁴, így nekem is megfelelőnek tűnt kicsit filozofikusabbra venni a hangvételt. Emellett erről a tényleg csodálatos 15 évről nem akarok egy száraz szakmai művet tenni az olvasók elé*⁵, hanem szeretném érzékeltetni azt a kivételes izgalmat, amit az össejtkutatás felvirágzása okozott a 21. század elején.

2003 őszén a PhD értekezésem sikeres védeke után posztdoktori éveket terveztem Párizsban, de a 2004-es év már két gyermekét egyedül nevelő anyaként és új témát kereső kutatóként talált. A nehézségek elviselésében nagy segítségemre volt a kutató részleg akkori vezetője, Sarkadi Balázs, aki szokása szerint a munkaterápiát javasolta, és két kitűnő kollégám, Barry Elkind és Szentpétery Zsófia, akikkel eddigi életem legtöbbet idézett (megosztott első szerzős) cikkét hoztuk össze [1], az ABCG2 és az EGF receptor gátlók kapcsolatát vizsgálva. Bár erről a munkáról nem lesz szó a dolgozatban, és nem lesz szó arról se, hogy milyen kacskaringókkal jutottam végül az össejtekhez, a végeredmény a fontos; tudniillik, hogy eljutottam odáig!

Akadémiai doktori értekezésemben így a PhD fokozat megszerzése utáni össejtekkel kapcsolatos kutatásom eredményeit mutatom be. De még mielőtt a szűkebb témába belevágnék, szeretnék egy össejtkutatási szempontból inkább kitérőt jelentő, a dolgozatban a továbbiakban nem szereplő vizsgálatssorozatát megemlíteni.

² Előre elnézést kérek azoktól, akik esetleg nem találják megfelelőnek ezt a formát, remélem, a tartalom majd kárpótolja Őket! Ez esetben az előszót át is ugorhatják...

³ A COVID-19-ről van szó (arra az esetre, ha az utókor is megtisztelne azzal, hogy olvassa a művet és addigra további koronavírus járványok is érkeznének).

⁴ A Galaxis útikalauz stopposoknak című regényben, szuperintelligens pándimenzionális lények – akiknek az egérformája csak a mi dimenziókba való betüremkedés, – feltették a kérdést szuperszámítógépüknek, Bölcs Elmének az életről, a világmindenségről meg mindenről. Bölcs Elmének hét és fél millió évig tartott, hogy kiszámolja a választ, ami a 42 volt. (Douglas Adams/Wikipédia)

⁵ Az az illúzióm van, hogy ha olvasmányosra írom meg ezt a dolgozatot, akkor többen fogják elolvasni...

2012-ben a Transrat pályázat keretében létrehoztunk egy kalciumindikátor fehérjét (GCaMP2) kifejező patkány modellt, amelyben elsősorban a szívizom kalcium-jeleit kívántuk vizsgálni. A modellről szó esik Orbán Tamás nagydoktori értekezésében, ott megtalálhatók az érdekes részletek. A kalcium szignalizáció mindig is érdekelt, így a patkányok megszületése után el is kezdtük a szívizmok *in vitro* működését vizsgálni [2], két kiemelkedően tehetséges és kitartó PhD hallgatóval. Ők javasolták, hogy a szív mellett vizsgáljuk a vesét is, mert a proximális tubulusokban nagyon erősen expresszálódó kalcium indikátor különleges lehetőséget adna az *in vivo* vizsgálatokra is. Szabó Kornéliának (a laboromban végezte a PhD munkáit) és Füredi Andrásnak (Szakács Gergely PhD hallgatója volt) köszönhetem, hogy megtapasztalhattam milyen az, ha a kutató ideális körülmények között dolgozhat. Csatlakozott hozzánk Csohány Róza (Szabó Attila (SE) PhD hallgatója), aki gyakorlott volt a patkányvese *in vivo* iszkémia-reperfúziós modell vizsgálatában. Sarkadi Balázs pedig ötleteivel újra és újra feltöltötte a teendő listáját. 2014 tavasza és nyara lázas kísérleti munkában telt, és év végére összeállt az a kézirat, amelyben sikerült a terület néhány sejtjét kísérletesen is igazolni; megmutattuk, hogy a vesében a proximális tubulusoknak csak egy része működik egyszerre, és a működőkben magasabb az intracelluláris kalcium koncentráció, ráadásul itt a kalcium szint oszcillációja is megfigyelhető [3]. Remek csapat volt, köszönöm mindenkinek!

A PhD fokozat megszerzését követően az őssejtkutatás számomra teljesen új téma volt, amelynek elindítása a megfelelő laboratóriumok kiépítésével, új kollégák és együttműködő partnerek keresésével kezdődött. Amire büszke vagyok, hogy az elmúlt bő 15 év alatt sikerült létrehozni egy olyan csapatot, amelyben megvalósult a színvonalas kutatás, a magasszintű szakmai képzés és a széleskörű ismeretterjesztés is. Ebben a doktori értekezésben összefoglalom a legfontosabb részeit annak a munkának, amelyet a pluripotens őssejtek kutatása során végeztünk és publikáltunk; az őssejtek létrehozásán és jellemzésén át a segítségükkel megismert sejtbiológiai folyamatok és betegségmodellek bemutatásáig.

Sok remek kutatóval dolgoztam együtt és rengeteg segítséget kaptam, így engedjék meg, hogy az értekezés megfelelő helyén említsem meg őket. Életem „Horger Antalját” nem kívánom megörökíteni, de higgyék el, létezik a magyar kutató számára üvegplafon és abban többször is bele lehet fejleni*⁶.

⁶ Ami nem öl meg, az megerősít. ("Was mich nicht umbringt, macht mich stärker." állítólag Nietzsche)

TARTALOMJEGYZÉK

AJÁNLÁS	3
ELŐSZÓ.....	4
TARTALOMJEGYZÉK	6
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE	8
ÖSZEFoglalás	10
1. IRODALMI BEVEZETŐ	11
1.1. Az őssejtekről röviden	11
1.2. A „mindentudó” őssejt, avagy milyenek a pluripotens őssejtek	15
1.3. Az őssejtek funkcionális vizsgálatainak szereplői.....	28
2. CÉLKITŰZÉSEK	33
3. MÓDSZEREK	34
3.1. Őssejtvonalak tenyésztése és differenciáltatása	34
3.1.1. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és tenyésztése	34
3.1.2. Humán pluripotens őssejtvonalak transzfekciója	35
3.1.3. Humán pluripotens őssejtvonalak differenciáltatása.....	36
3.1.4. Humán pluripotens őssejtek és differenciáltatott származékaik jellemzése.....	37
3.2. Humán pluripotens őssejtek és differenciáltatott származékaik funkcionális jellemzése	39
3.2.1. Hoechst 33342 felvétel	39
3.2.2. Kalcium jelek vizsgálata	39
3.2.3. Invadopodia vizsgálat	39
3.2.4. Statisztikai módszerek	39
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....	40
4.1. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és jellemzése	40
4.2. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és vizsgálata.....	45
4.2.1. Milyen multidrog transzporterek működnek a pluripotens őssejteken?	45
4.2.2. Mire használja az őssejt a transzportereket?.....	52
4.2.3. Milyen az ABC transzporterek mintázata a pluripotens őssejteken illetve a belőlük differenciáltatott sejtípusokon?	57
4.2.4. Hogyan használható ez a tudás drog rezisztens szövetek tervezésében?	62
4.3. Milyen a pluripotens őssejtek kalcium szignalizációja és milyen módszerekkel érdemes ezt vizsgálni?	68
4.3.1. Kalcium szignálok humán pluripotens őssejtekben	68

4.3.2. Kalcium szignálok mérése genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével.....	72
4.3.3. Kalcium szignalizáció vizsgálata genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével hPSC –eredetű idegsejtekben	77
4.4. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek jellemzői és felhasználási lehetőségeik	84
4.4.1. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek immunológiai tulajdonságai	84
4.4.2. A Frank Ter Haar szindróma humán pluripotens őssejt-alapú modellje	90
5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	96
6. TERVEK ÉS KITEKINTÉS	98
7. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK.....	102
8. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK.....	104
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	108
10. IRODALOMJEGYZÉK	109
11. A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK EREDETI VERZIÓI.....	125

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

ABC– ATP Binding Cassette, jellegzetes ATP-kötő domént tartalmazó fehérjecsalád neve
 ABCG2 – az ABCG fehérjecsalád másodikként felfedezett tagja
 AFP – alfa-fetoprotein
 APC – allofikocianin APC
 BRY – Brachyury
 BSA – borjú szérum albumin
 c-Myc – c-Myc protoonkogén
 cTnI – szívspecifikus troponin I
 CRISPR/Cas9 – génszerkesztési módszer (Clustered Regularly Interspaced Short
 Palindromic Repeats/Cas 9 endonukleáz)
 DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole
 DCV – DyeCycleViolet
 DMSO – dimetil-szulfoxid
 DPBS – Dubecco-féle foszfáttal pufferelt sóoldat
 EB - embriótest
 ER – endoplazmatikus retikulum
 ESC – embrionális őssejt
 FBS – főtális borjú szérum
 FGF – fibroblaszt növekedési faktor
 FITC – Fluoreszcein-izotiocianát
 GABA – γ -aminovajsav
 GAPDH – Gliceraldehyd-3-foszfát-dehidrogenáz
 GD – Gyrus Dentatus
 GCaMP – genetically encoded calcium indicator
 GFP – green fluorescent protein, zölden fluoreszkáló fehérje
 GWAS – teljes genomot áttekintő asszociációs vizsgálatok
 hPSC – humán pluripotens őssejtek
 HUES – Humán embrionális őssejt vonal
 HFF – Humán előbőr fibroblaszt sejt
 Hst – Hoechst 33342, fluoreszcens festék
 iPSC – indukált pluripotens őssejt
 Klf4 – Kruppel-like faktor 4
 Ko143 –ABCG2 specifikus gátlószer
 LIF – leukémia-gátló factor
 MAF – multidrog rezisztencia aktivitási faktor
 MAP2 – mikrotubulus asszociált protein 2
 MDR – multidrog rezisztens
 MEF – egér embrionális fibroblaszt
 MSC – mezenchimális őssejt

MSC1 – Mezenchimális őssejt szerű sejtek
 MX – Mitoxantron
 nestin – neuroepithél őssejt fehérje
 NeuroD1 – Neurogén differenciációs faktor 1
 NMDA – N-metil-D-aszparaginsav
 NPC – neurális progenitor sejt
 NANOG – Homeobox pluripotencia transzkripció faktor
 Oct4 – Oktamer-kötő transzkripció faktor
 PAX6 – Paired box protein-6
 PBMC – perifériás vér mononukleáris sejtek
 PBS - foszfáttal puffertelt sóoldat
 PE – fikoeritrin
 PFA – paraformaldehid
 PI – propídium-jodid
 PODXL – Podocalyxin szerű fehérje
 PRLP0 – Riboszóma 60S alegység fehérjéje
 Prox1 – Prospero homeobox protein 1
 PSC – pluripotens őssejt
 PSD95 – posztzinaptikus denzitás fehérje-95
 ROCK – Rho-asszociált protein-kináz
 SB – Sleeping Beauty (Csipkerózsika) transzpozon
 SCID – súlyos kombinált immunhiányos
 SMA – sima izom aktin
 SOCE – Store Operated Calcium Entry, a sejten belüli kalcium raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlás
 Sox2 – SRY-box 2
 SP – Side population
 SSEA3 és SSEA4 – állapot-specifikus embrió antigén- 3 és 4
 STR – short tandem repeat
 TLDA – Taqman Low Density Array
 TRA-1-60 és TRA-1-81 – tumor rezisztencia antigén 1-61 és 1-81
 TTX – tetrodotoxin
 TUB – β -3-tubulin
 ULA – ultra alacsony tapadási felület
 UV-C – Ultraviola-C fény
 qRT-PCR – kvantitatív valós idejű PCR technika
 WGA – Wheat germ agglutinin
 WT – vad típus (wild type)

ÖSZEFoglalás

Akadémiai doktori értekezésemben a PhD fokozatom megszerzése utáni kutatásom eredményeit mutatom be. A fokozat megszerzését követően teljesen új témába kezdtem, aminek az elindítása a megfelelő laborok kiépítésével, új kollégák és együttműködő partnerek keresésével kezdődött. Az elmúlt bő 15 év alatt sikerült létrehozni egy olyan laboratóriumot, ahol megvalósult a színvonalas kutatás, a magas szintű szakmai képzés és a széleskörű ismeretterjesztés is. Dolgozatomban összefoglalom egy részét annak a munkának, amit a pluripotens őssejtek kutatása során végeztünk és publikáltunk; az őssejtvonalak létrehozásán és jellemzésén át az általuk megismert sejtbiológiai folyamatok és betegség modellek bemutatásáig.

Meghonosítottuk Magyarországon a humán pluripotens őssejtek kutatásának alapjait. Több mint 40 humán pluripotens sejtvonalat hoztunk létre, egyrészt szomatikus sejtek pluripotens állapotba történő visszaprogramozásával, másrészt már létező sejtvonalak stabil genetikai módosításával. Ezeket a sejtvonalatokat a terület szigorú elvárásainak megfelelően jellemeztük. A pluripotens állapotú sejtek tulajdonságainak megismerésére jelentős új eredmények születtek a laboratóriumunkban:

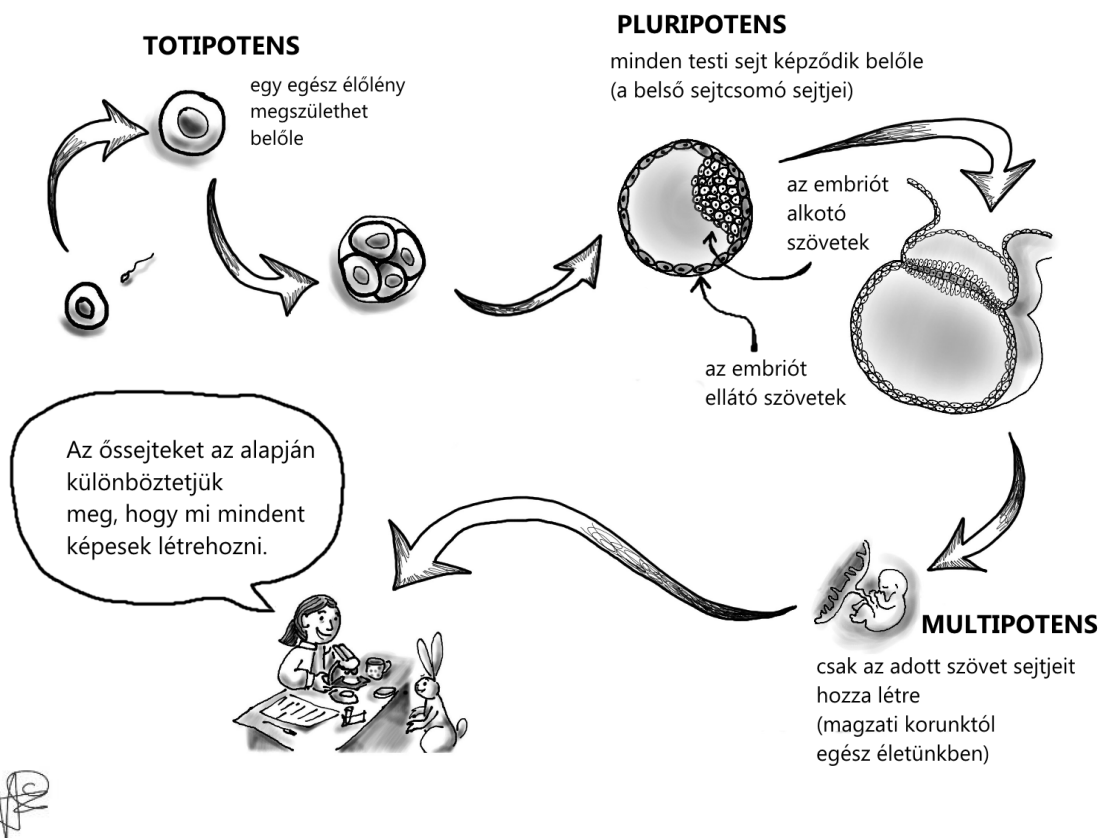
Megmutattuk, hogy a pluripotens őssejteken az ABCG2 a fő multidrog transzporter, expressziója heterogén az őssejtpopuláción belül és az adott genetikai háttér és mikrokörnyezet határozza meg. Az ABCG2 kifejeződése nem feltétele a pluripotens állapotnak, azonban az őssejteket különböző stresszhatásoktól védő ABCG2 kifejeződése előnyt jelent az őssejt populáció fenntartásában. A pluripotens őssejtek differenciációjakor az ABCG2 expressziója csökken és más ABC transzporterek kifejeződése indul meg, ebből a szempontból a különbözően differenciálódó sejtek egyedi expressziós profilt (ujjlenyomat) mutatnak. Az ABCG2 túltermelése nem változtatja meg a pluripotens állapotot és védelmet nyújthat olyan szövetek pótlásakor, amelyek nem fejezik ki az ABCG2-t, de ki vannak téve citotoxikus hatásoknak.

Elsőként jellemeztük a pluripotens állapotú sejtek Ca-jeleit különböző indukálószerrek hatására és kidolgoztuk a kalcium jel mérésének módszerét kétféle technikával is. Humán pluripotens őssejtekből szívizomsejteket, idegi sejt típusokat és mezenchimális őssejteket hoztunk létre. Ezeket a sejt típusokat nem csak fenotípusosan jellemeztük, hanem funkcionális vizsgálatokat is végeztünk. A megszerzett ismereteket az utóbbi években betegségmodellek kidolgozására használjuk, dolgozatomban példaként egy monogénes betegség a Frank Ter Haar szindróma génszerkesztéssel létrehozott modelljét tárgyalom.

1. IRODALMI BEVEZETŐ

1.1. Az őssejtekről röviden

Azzal illene indulni, hogy definiálom, mi is az az őssejt. Sajnos a mai napig egyetértek avval a kollégával, aki egyszer azt mondta „Ha mi azt tudnánk!”. Ha mégis definiálnom kéne, valami ilyesmit mondanék: nem specializálódott, korlátlan számú osztódásra és önmegújulásra képes sejt, amely aszimmetrikus osztódás révén egy önmagával megegyező és egy elkötelezettebb/érettebb utódsejtet is létre tud hozni. Ez a definíció nem tökéletes*⁷, de elindulhatunk vele és górcső alá vehetjük az őssejtek formáit. Mai tudásunk szerint az őssejteket fejlődési potenciáljuk alapján három nagy csoportba osztjuk; totipotens, pluripotens és multipotens őssejtekről beszélünk (1. ábra). Ezek a kategóriák természetesen mesterségesek, mert egy életen át tartó folyamatot próbálunk beszorítani három csoportba.



1. ábra Az őssejtek típusai és fejlődési potenciálja (Hollebrbach Emil grafikája)

*⁷ A definíciók nehéz diók! Évekkel ezelőtt szerencsém volt részt venni az EMA (European Medical Agency) Advanced Therapy bizottságának (CAT) egyik ülésén, ahol az aktuális beadványok mellett azon igyekeztek, hogy definiálják a „sejt” fogalmát. Másfél óra heves vita után (főleg a vörösvérsejtek okoztak kellemetlenséget), a megfogalmazott definícióról megkérdezték az ott ülő betegjogi képviselőt is, aki nagyon udvariasan azt mondta, hogy ebből egy átlagember semmit nem ért, pedig ha Őt részesítik sejterápiában, az mégis ártana... Még sok ülés és rengeteg egyeztetés folyt le, mire megegyezés született.

Totipotensek a megtermékenyített petesejt és a szedercsira sejtjei nyolcsejtes állapotig. A definíció állatkísérleteken*⁸ alapul, ugyanis, ha egy nyolcsejtes embrió egyetlen sejtjét kiemeljük és egy megfelelően előkészített terhes anyaállatba visszahelyezzük, akkor abból utód születhet, aminek a genetikai állománya a behelyezett sejtől származik. A totipotens sejt tehát képes az embrionális és az extraembrionális szöveteket is létrehozni. Ez a kísérlet emberen természetesen nem végezhető el, mert a világ minden országában (bölcsen) tiltják. Arra, hogy a meghatározás mégis vonatkoztatható az emberre is, a pre-implantációs diagnosztikai eljárásokból következtethetünk. Ennek során a nyolcsejtes embrió egy sejtjét kivesszük és DNS vizsgálatot végeznek rajta, hogy kiszűrjék azokat az embriókat, amelyek súlyos genetikai betegséget hordoznak. Az egészségesnek talált embrió(k) hét sejtjét visszaültetve egészséges gyermek születik, ami arra utal, hogy a sejtek ebben az állapotban totipotensek. A totipotens sejteket az állattenyésztésben kivételesen értékes tenyészállatok klónozására vagy kihalófélben lévő fajok megmentésére használják. Állati zigóták genetikai módosítása (az emberrel ellentétben*⁹) engedélyezhető és az orvosbiológiai kutatásokban is nagyon hasznos eszköznek bizonyult.

A fejlődésben a következő állapot, amit elkülönítünk, a pluripotens állapot. Pluripotensek a hólyagsíra állapotú embrió belső sejtsomójában lévő sejtek, amelyekből az összes testi sejt létrejön, míg a hólyagsíra külső sejtrétegéből az extraembrionális szövetek keletkeznek. Ebből következik, hogy ha az előbb említett állatkísérlet során nem totipotens, hanem pluripotens sejtet teszünk vissza egy terhes anyába, akkor abból nem születhet utód (mivel az extraembrionális szövetek nélkül ez nem lehetséges). Viszont, ha egy ilyen pluripotens sejtet egy már létező embrióba helyezünk, akkor olyan állataink születnek, amelyeknek minden szövetében található a donor sejtől származó sejt is, tehát valóban; a pluripotens sejt minden szöveti sejtfeleség létrehozására képes.

Ezután csak a fantáziánk szab határt annak, hogy elképzeljünk különböző színű, formájú vagy pl., ha a beültetendő sejtet genetikailag módosítjuk, akkor különböző fluoreszcens fehérjéket kifejező állatokat.

*⁸ Elsősorban egérről beszélünk, ha állatkísérletet emlegetünk, ha nem, azt mindig kiemelem.

*⁹ A tavalyi év (2019) nagy etikai vitát kavart és aztán büntetőjogi pert is eredményező kísérlete emberi zigótákból génszerkesztéssel módosított ikerpár születéséhez vezetett. Jelenleg az egész fejlett világban tiltják az emberi zigóta reprodukciós célú genetikai módosítását (Ledford H. CRISPR gene editing in human embryos wrecks chromosomal mayhem. Nature. 2020, doi: 10.1038/d41586-020-01906-4. PMID: 32606465).

Annak a felfedezése, hogy a hólyagcsíra belső sejtsomójából nyerhető sejtek laboratóriumi körülmények között tenyésztethetők, belőlük sejtvonalak hozhatók létre [4] és, hogy ezek a sejtvonalak genetikailag módosíthatóak és mindenféle sejtípus létrehozható belőlük *in vitro* körülmények között is, Martin Evans-nak, Mario Capecchi-nak és Oliver Smithies-nak Nobel díjat, a világ kutatóinak pedig hihetetlenül széles kutatási (játászó)teret eredményezett*¹⁰. Ez a lehetőség, többek között, nagyban elősegítette a betegségek mechanizmusának kutatását. Mivel ezeknek a pluripotens állapotú „donor” sejteknek az utódai az embrióba visszaültetve minden szövetben megjelennek, így az ivarsejtek között is megtalálhatóak. Ezt a szakmában germline transzmisszióknak nevezzük. Könnyen elképzelhető, hogy az ilyen utódok keresztezésével olyan állatok jöhetnek létre, amelyek ezekből a „donor” sejtekből keletkeznek. Amennyiben a donor sejtekben egy-egy fehérje génjét kiütjük, akkor Knock Out (KO) állatokhoz jutunk, amelyekben a fehérje *in vivo* funkciója vizsgálható. Ha pedig olyan mutációkat hozunk létre, amelyek egy emberi betegséghez köthetők, akkor betegségmodellekhez jutunk. Ha csak „egyszerűen” megjelölünk (például egy fluoreszcens marker segítségével) különböző géneket vagy sejt sorokat, akkor követhetjük a fejlődési vagy a regenerációs folyamatok során a sejtek sorsát.

A következő fejlődési állapot a beágyazódás során létrejövő primitív szövetek (ektoderma, mezoderma és endoderma) megjelenéséhez köthető, ezek az ősei azoknak a szöveteknek, amelyek később a kifejlett szervezetben is megjelennek. Ezek a primitív szövetek illetve a később a különböző szövetekben megtalálható szövetre jellemző őssejtek multipotensek, ami azt jelenti, hogy az adott szövetre specifikus sejtfeleségek létrehozásáért felelősek egész életünkben.

A multipotens sejteket szöveti őssejteknek is szokás nevezni, arra utalva, hogy a szervezetben a különböző szövetekben kulcsfontosságú szerepük van a szövet homeosztázisának fenntartásában, illetve a regenerációs folyamatokban. A multipotens sejteket szokás további kategóriákba is sorolni; az oligopotens őssejtek több sejtfeleséget képesek létrehozni (például a vérképző őssejt a teljes vérképzést biztosítja vagy a mezenchimális sejtekből csont, bőr és porc is keletkezhet), de ismerünk bipotens (máj progenitorok) vagy unipotens őssejteket is (az izomsejteket létrehozó ún. szatellita sejtek szaporodóképes sejtek, de csak izomsejtekké tudnak érni).

*¹⁰ 1981-ben történt és 2007-ben orvostudományi Nobel-díjat eredményezett.

A multipotens sejtek a szervezetben osztódóképesek és megőrzik differenciálatlan tulajdonságaikat, de laboratóriumi körülmények között az osztódás hamar leáll és a sejtek differenciálódni kezdenek.

Jelentős különbségek vannak a különböző multipotens sejtek mennyiségét illetően is a különböző szövetek között; a gyorsan cserélődő sejtfeleségek (vér, bőr, bélhám) őssejtjei sokan vannak és gyors regenerációra képesek, ezért viszonylag hamar fel is fedezték őket. A vérképző őssejtek bőven kitartanak életünk végéig, ezért adhatunk belőle beteg embertársainknak is, hogy a kórosan működő csontvelői őssejtjeiket kicseréljék egészségen működőre. Ezen alapul a csontvelő transzplantáció több mint 50 éves múltja. Azt, hogy a kevésbé regenerálódó szövetek (szívizom, idegsejtek) között is vannak őssejtek (bár igen kevesen), csak az utóbbi évtizedek kutatásai tárták fel és bár nagy a jelentőségük a szervezet egészséges működésében, a szív vagy idegsejtek donációja nem járható út a betegek kezelésére.

Mielőtt rátérnék a humán pluripotens őssejtvonalak részletes bemutatására, amelyek reményeink szerint alkalmasak lesznek a nehezen hozzáférhető őssejtfeleségek pótlásán keresztül a betegségek gyógyítására is, hadd említsek meg néhány problémát, ami az „őssejtiséggel” kapcsolatban felmerül. Az előzőekben felvázolt definíció és hierarchia az őssejtekre vonatkozóan jól használható az őssejtkutatók számára, és a vér-, bőr- vagy bélbetegségekkel foglalkozó klinikus/kutató is jó modellt tud alkotni a segítségükkel. Embriológiával foglalkozó társaink azonban már nem ennyire elégedettek. Jogosan merül fel a kérdés (néhány szemfülesebb hallgatomban is), hogy miért emeljük ki az embrió- és magzatfejlődés bizonyos pontjait, hogy azzal definiáljunk állapotokat, miközben ez teljesen önkényes, ti. a fejlődés folyamatos? Hogy nevezhetünk őssejtnek (lásd fenti definíció) valamit, ami kettőt-hármat osztódik és el is tűnik, hiszen a kifejlett szervezetben általában*¹¹ nem fordulnak elő toti- vagy pluripotens sejtek? Ha egy ilyen állapotú sejt mégis korlátlan számú osztódásra lesz képes, akkor sajnos rosszindulatú elváltozást okoz (lásd embrionális karcinómák)! Erre legfeljebb annyit tudok mondani, hogy a definíciók és a modellek nélkül nem tudunk dolgozni, de ismernünk kell a korlátaikat. A modell/definíció határain kívül nem érdemes következtetéseket levonni, hanem inkább új munkahipotézist kell felállítani, ami új definíciókhoz és modellekhez vezet. Munkánk során igyekeztünk a következtetések levonásakor ezt az elvet szem előtt tartani. A következő fejezetben a pluripotens állapotú sejtekről lesz szó, mivel ezek a sejtek állnak kíváncsiságunk és kutatásaink fókuszában.

*¹¹ Kivéve azt az áldott állapotot, amikor egy új élőlény fejlődik a felnőtt szervezetben.

1.2. A „mindentudó” őssejt, avagy milyenek a pluripotens őssejtek

Amint azt már az előző alfejezetben is említettem, az egér embrionális őssejtvonalak felfedezése alapjaiban változtatta meg az őssejtekről alkotott nézeteinket. Addig a vérképző őssejtet hívták pluripotensnek*¹², mivel valóban sokféle sejtípus létrehozására képes, de mikor kiderült, hogy van olyan sejtípus, ami még ennél is többet tud, a vérképző őssejt „lecsúszott” a multipotens/szöveti őssejtek közé. Amikor 1981-ben kiderült, hogy ezekből az egér embrióban pluripotens állapotú sejtekből sejtvonalat lehet létrehozni, az nagy lendületet adott több kutatási területnek is. A sejt- és fejlődésbiológiai kutatások és a gyógyszerkutatás fejlődése mellett, előkészítette a talajt a humán pluripotencia vizsgálatához, ami még nagyobb reményeket és elvárásokat keltett tudományos körökben és a mindennapi élet szintjén is.

1.2.1. Mit tudunk ezekről a humán pluripotens őssejtekről?

1998-ban James Thomson és munkatársai először bizonyították, hogy az egérhez hasonlóan humán blasztocisztából is lehet pluripotens őssejtvonalat alapítani [5]. Az eljárás az egéren bevált módszereken alapult; a hólyagsíra állapotú embrió külső sejtrétegét (trofektodermáját) immunsebészeti eljárással eltávolították [6], majd a belső sejtcsomót mitotikusan inaktivált embrionális egér fibroblaszt dajkasejt (MEF) rétegen tenyésztették tovább [4]. Az így izolált sejtek folyamatosan osztódtak, hónapokig fenntarthatók voltak és hamarosan (2000 elején) arról is megjelentek közlemények, hogy a tenyésztési körülmények megváltoztatásával mindhárom csíralemez irányába spontán tudnak differenciálódni [7, 8].

A differenciációs protokollok akkoriban azon alapultak, hogy az embrionális őssejteket a dajkasejt rétegről enzimatikusan eltávolítva, megemelt szérum tartalmú, szuszpenziós médiumban tartva, embriótesteket alkotnak (EB-embryoid body), amelyekben megindul a sejtérés. Ha néhány nap múlva az embriótesteket adherens felületre teszik (általában zselatint alkalmaztak), akkor az EB-k letapadnak és a legkülönbözőbb sejtípusok fedezhetők fel a tenyészetekben. Látványos a szívizom telepek dobogása vagy a neurális progenitorok virágszirmokként elterülő rozettái, de a pigmentált epitél sejtek fekete foltjai is (amelyek a tapasztalatlan kutatót először rémülettel töltik el, mert a tenyészet úgy néz ki, mintha bepenészedett volna) különleges látványt nyújtanak.

*¹² Hematológus kollégáink elég nehezen szoknak hozzá az új nevezéktanhoz, de megértem őket! Az őssejtkutatás évtizedes dogmákat döntött romba pár év alatt.

A probléma az így létrehozott spontán differenciálódott sejtekkel az volt, hogy minden tenyészet különböző összetételű, így egy-egy sejtípust nehéz vizsgálni benne. A kívánt sejtípusok feldúsítása a spontán tenyészetekben az egyik út, amin elindultak az őssejtkutatók; 2001-ben több olyan közlemény is megjelent, amelyben a sejtterápiás szempontból fontos sejtípusok (szívizom [9], idegsejtek [10] és inzulintermelő sejtek [11]) feldúsításáról számoltak be. A kutatások elsősorban amerikai, izraeli és ausztrál laboratóriumokban folytak, mivel itt alapították az első humán embrionális őssejtvonalakat.

Az erővonalak azonban hamarosan átrajzolódtak, és az USA jelentős lemaradásba került a Bush érában*¹³, ami viszont elindította az egész világon, így Magyarországon is, a humán embrionális őssejtkutatást. Történt ugyanis, hogy Douglas Melton (HHMI), az őssejtek terápiás felhasználásának elkötelezett kutatója, közzétette, hogy minden érdeklődő kutatónak átadja az általuk alapított humán embrionális őssejtvonalakat, ingyen és bérmentve, hogy a kutatások egyre szélesebb körben folyjanak, ha már az USA-ban némi toporgás következett be. Csak azt kellett bizonyítanunk, hogy a magyar törvények nem tiltják az ilyen jellegű kutatást. Mondanom sem kell, hogy ilyen bizonyításra a magyar joggyakorlatban még nem volt példa, de néhány hónapos intenzív egyeztetés után Dr. Sándor Judit jogásszal*¹⁴ sikerült a vonatkozó törvényt értelmezni és egy etikai engedély beadványt megfogalmazni. 2005. február 5-én meg is kaptuk az első humán embrionális őssejteken végezhető kutatásokra vonatkozó engedélyt (ami első és legjobb tudomásom szerint eddig egyedülálló Magyarországon). Ezzel az engedéllyel felfegyverkezve írtunk a HHMI-s kutatócsoportnak, akik el is küldtek négy őssejtvonalat, és Varga Nóra PhD hallgatóval kettesben el is kezdtük az első sejtvonala vizsgálatát.

Ahogy a kezdeti eredményeket alátámasztó publikációk sorra megjelentek, a terület dinamikus fejlődésnek indult. Ha a humán embrionális őssejtekből valóban stabil őssejtvonalak alapíthatók, amelyek minden testi sejt létrehozására képesek (ahogy azt a követő közlemények is megerősítették), akkor ezek a sejtek illetve az ezekből a sejtekből származó érettebb sejtípusok használhatók lesznek terápiás célokra!

*¹³ 2001.augusztus 9-én. George Bush bejelentette, hogy radikálisan korlátozzák a humán embrionális őssejtek kutatására fordítható állami forrásokat. <http://georgewbush-whitehouse.archives.gov/news/releases/2001/08/20010809-2.html>.

*¹⁴ Akinek örök hálám...és ennek jeléül azóta is több projektben veszünk részt és érdekes etikai vitáink vannak az őssejtkutatás és terápiás megfontolások területén.

Az őssejtterápiák alapja, hogy a szervezetben rosszul működő vagy hiányozó sejtípusokat az őssejtekből létrehozott egészséges sejtekkel pótoljuk. Már 2001-ben megjelent az első transzplantációs kísérletet leíró munka, amelyben ES-ből származó neurális progenitorokat ültettek be újszülött egerek agyába, ahol ezek megtapadtak és tovább differenciálódtak [12].

Hatalmas remények és éles társadalmi viták támadtak a humán ES-sejtekkel kapcsolatban*¹⁵, de az biztos volt, hogy a terápiák bevezetéséhez az őssejteket jobban meg kell ismerni, új és hatékony differenciációs protokollokra illetve a kívánt irányba differenciált sejtek megfelelő tisztaságát biztosító elválasztási módszerekre és az állati termékek kizárására lesz szükség. Már az első humán ES-sejtet leíró cikkben vizsgáltak néhány pluripotenciára jellemző tulajdonságot, amelyek az egérből és a selyemmajomból származtatott ES-sejtek esetében informatívnak bizonyultak; a pluripotens őssejtek magas telomeráz és alkalikus foszfatáz aktivitással rendelkeznek, felszínükön kifejezik az állapot-specifikus antigéneket (SSEA) és teratomát képeznek [5]. További kritériumként jelent meg a kulcs transzkripciós faktorok jelenléte a pluripotens őssejtek sejtmagjában; az OCT3/4, a Sox2 és a Nanog a pluripotencia fenntartásához elengedhetetlenek és egymással szoros összeköttetésben működnek [13].

Az egér embrionális őssejtekkel való számos hasonlóság mellett azonban már ezekben a korai munkákban is kiderült néhány jelentős különbség is [14]. Az egér embrionális őssejtcsomók domb-szerűen emelkednek ki a dajkasejt-rétegről, míg a humán ES sejtek lapos, elterült csomókat alkotnak. Az állapot-specifikus antigének közül az egér ES sejtek az SSEA1-et, míg a humán ES sejtek az SSEA4-et fejezik ki, illetve az egér sejtek pluripotens állapotban való tartásához szükséges a LIF (leukémia inhibitor faktor), míg a humán sejtek esetében a bFGF (alap fibroblaszt növekedési faktor) illetve a TGF- β (tumor növekedési faktor béta) útvonalak biztosítják a pluripotencia fenntartásához szükséges szignálokat. Az egér ES sejtek nem differenciálthatók trofoblaszt irányba, míg humán megfelelőik esetében ez viszonylag egyszerűen kivitelezhető. Évekkel később kiderült, hogy a fajok közötti különbözőségeken kívül ezek az eltérések egy fejlődéstani szempontból fontos különbségre mutattak rá.

*¹⁵ A humán embrionális őssejtvonalak alapítása közben az *in vitro* fertilizáció során visszamaradt embriókat használják fel és ez komoly etikai aggályokat vetett fel, elsősorban a katolikus egyház részéről. Dolgozatomban az őssejtkutatás orvosi biológiai vonatkozásairól írok és igyekszem elkerülni az etikai ingoványos területét, már csak azért is, mert ebben nem érzem magam szakértőnek.

1.2.2. „naïv versus primed”

2007-ben új típusú pluripotens sejtvonalkat hoztak létre post-implantációs egér embriókból, amelyeket epiblast-eredetű őssejtnak (EpiSC) neveztek el [15]. Ezek az EpiS sejtek különböztek az egér ES sejtvonalktól és nagyban hasonlítottak a humán ES vonalakhhoz. A kétféle pluripotens állapot definíciója két évvel később született meg [16], az egér ES-nek megfelelő állapot a „naïv”, az egér EpiS-nek megfelelő, pedig a „primed” nevet kapta. Hamarosan az is kiderült, hogy a két állapot egymásba átalakítható, a tenyésztési körülmények változtatásával [17].

Ami a humán eredetű pluripotens őssejtekkel illti, bár akadnak olyan molekuláris és biológia tulajdonságaik, amelyek a naïv állapotú egér ES sejtekkel azonosak, mégis inkább hasonlítanak a primed állapotú egér epiES sejtekhez. Kisebb nagyobb nehézségek árán, sikerült a tenyésztési körülmények megváltoztatásával és/vagy genetikai módosításokkal a már megalapított primed állapotú őssejtvonalkból naïv állapotú tenyészeteket előállítani [18-21], illetve új, naïv állapotú őssejtvonalkat alapítani [22]. A naïv állapotú sejtek vizsgálata nemcsak elméleti szempontból érdekes, hanem gyakorlati jelentősége is lehet. A primed humán ES vonalak ugyanis nem egyformán „szeretnek” minden sejtípust létrehozni, azaz különböző irányokba eltérő hatékonysággal differenciálódnak [23]. Mivel az egér vonalakra ez nem annyira jellemző, adódott a kérdés, hogy vajon a naïv állapotú emberi sejtvonalak nem lesznek-e hatékonyabbak. Sajnos a gyakorlat nem igazolta a várakozásokat; a differenciációs hatékonyság nem lett kedvezőbb, ellenben a humán vonalak esetében a naïv állapot fenntartása nehezen kivitelezhető. A későbbi kutatások viszont azt igazolták, hogy humán/állat kimérákat csak naïv állapotú sejtekből lehet létrehozni, így a naïv sejteknek is meg lehet a jelentősége a jövő kutatásában és gyógyításában. Az orvosi alkalmazások miatt elsősorban sertés embriókkal kísérleteznek ezen a téren, humanizált sertés modellek létrehozása céljából.

1.2.3. Az indukált pluripotencia felfedezése

Míg a világ nagy részén a pluripotens állapotok megértésével foglalkoztak, addig Japánban olyan felfedezést tettek, ami teljesen megváltoztatta a sejtbiológia alapjait és forradalmasította az őssejtkutatást.

Shinya Yamanaka és Kazutoshi Takahasi 2006-ban tette közzé azt a felfedezésüket, hogy az érett, szöveti sejtjeket genetikai módszerekkel vissza lehet programozni az embrionális őssejtekhez nagyon hasonló pluripotens őssejteké. Az először egér sejteken [24], majd egy éven belül emberi sejteken is sikerrel alkalmazott [25] módszer lényege, hogy néhány speciális gén bejuttatásával az érett bőrsejtekből indukált pluripotens őssejtek (iPSC)

hozhatók létre. Kiindulásként 24 olyan transzkripciós faktor génjét alkalmazták, amelyekről az embrionális őssejtkutatások alapján kiderült, hogy pluripotens őssejt állapotban legjellemzőbben kifejeződő gének és meghatározó szerepet játszanak az őssejt-állapot fenntartásában. A bevitt gének számának fokozatos csökkentésével igazolódott, hogy elég 4 transzkripciós faktor génjét kifejeztetni – ezek az ún. Yamanaka faktorok: Oct4, Sox2, Myc és Klf4 - és az így létrehozott őssejtek képesek a test valamennyi sejtj típusává fejlődni, azaz pluripotens állapotba kerülnék.

Az eljárás olyan hatékonynak bizonyult, hogy ma már a módszer-változatok egész tárháza áll rendelkezésre iPS sejtek létrehozására, attól függően, hogy a hatékonyság, a biztonság vagy tudományos ismeretek bővítése a cél [26, 27]. A visszaprogramozáshoz gyakorlatilag bármely sejttaggal rendelkező sejt használható, a klasszikusan használt bőrsejtektől a vér mononukleáris sejtjein át a vizeletben található epitel jellegű sejtekig [27]. Az eddigi kísérletekből jól leszűrhető eredmény azonban, hogy az éretlenebb szomatikus sejtek hatékonyabban visszavihetők pluripotens állapotba. Az alkalmazott gének száma és minősége is változtatható – humán sejtek esetében például gyakran beviszik még a Lin28 gént is, ha a hatékonyságot kívánják növelni, de úgy tűnik, hogy az Oct4 nélkülözhetetlen. A génbeviteli módszerek megválasztása is a céltól függ: viszonylag gyors és hatékony a retrovírusos génbevitel, ugyanakkor transzpozonok felhasználásával el is lehet távolítani a bevitt géneket a sikeres átprogramozás után [28]. Ez utóbbi kísérletek rámutattak, hogy a gének időleges, tranziens jelenléte is elég a visszaprogramozás megvalósulásához, és egyre jobban elterjedt a nem integrálódó vektorokkal, módosított RNS-ekkel vagy a gének fehérjetermékeivel történő iPS készítés is (1. táblázat).

1.táblázat A visszaprogramozás különböző technikái és hatékonyságuk (%-ban kifejezve)

IPSC visszaprogramozási technikák és hatékonyságuk				
Vírus alapú		Transzgén	Nem-vírus alapú	
Beépülő	Nem-beépülő	Eltávolítható	Nukleinsav alapú	Nem-nukleinsav alapú
Retrovírus alapú ~0,01-0,4%	Adenovírus alapú ~0,0003-0,01%	Cre-loxP ~0,1-1%	Szintetikus mRNS alapú ~1-1,7%	Fehérje alapú ~0,0005-0,001%
Lentivírus alapú ~0,1-1%	Sendai-vírus alapú ~0,8-1,2	PiggyBac ~0,01-0,7%	miRNS alapú ~0,1%	Kis molekula alapú ~0,02%
			Vektor alapú ~0,08-1%	
			Liposzóma alapú ~0,035–0,040%	

<https://www.sigmaaldrich.com-alapján>

A létrehozás módszerétől függetlenül az indukált pluripotens őssejtekre jellemzőek mindazok a tulajdonságok, amelyeket az embrionális őssejtekkel kapcsolatban már megállapítottunk; kifejezik a pluripotencia markereket, megtartják a pluripotens állapotot, de a tenyésztési körülmények megváltoztatásával mindhárom csíralemez irányába differenciálódni tudnak és belőlük is létrehozhatók a legkülönbözőbb differenciált sejtípusok. Ez a felfedezés nemcsak azt bizonyította, hogy az érett sejtek képesek éretlenebb állapotú sejtekké átalakulni (dedifferenciálódás), de felvetették annak lehetőségét is, hogy személyre szabott őssejtekkel lehessen betegségeket gyógyítani*¹⁶!

1.2.4. A pluripotens őssejtek tenyésztése és jellemzése

A humán pluripotens őssejteket eleinte, az egér pluripotens őssejtekhez hasonlóan, osztódásgátolt egér embrionális fibroblaszt sejteken (MEF) ún. dajkasejt rétegen tenyésztették és a tenyésztő médiumba borjú szérumot és fibroblaszt növekedési faktor II (bFGF) kiegészítőt használtak. Hamarosan felmerült az igény az állati termékek kiküszöbölésére, hiszen ha emberi gyógyításra akarjuk használni az őssejteket, ezzel mindenképpen törődnünk kell. A médiumok állati terméktől mentesek és kémiaiilag jobban definiált összetételűek lettek, míg az egér fibroblaszt helyett megjelentek a humán dajkasejtek [29], illetve később a dajkasejtmentes tenyésztésre alkalmas extracelluláris mátrixok és az ehhez igazított médiumok is. Mára már elérhető több olyan tenyésztési módszer is, amelyekkel egysejt rétegben lehet az őssejteket tenyészteni és a Rho kináz inhibitorokkal (Rocki) elérték azt is [30], hogy egysejtes szuszpenzióban is túléljenek, illetve az egysejt klónozást is jobban viseljék, mint a dajkasejten tenyésztett társaik.

A humán pluripotens őssejtek jellemzésének szigorú szabályai vannak, amiket a sejtvonalak létrehozása és a további kísérletek során is folyamatosan be kell tartani. Ez azért fontos, mert a pluripotens állapot fenntartása nem annyira egyszerű, mint amilyennek azt az általános sejtenyésztési tapasztalattal rendelkező kutató gondolná. Ha a hPS sejteket túl ritkán szélesztjük, akkor nem szaporodnak, ha viszont túl sűrűn, akkor differenciálódni kezdenek. A részleges differenciáció azért kritikus, mert egyrészt megváltoztathatja a pluripotens sejtek tulajdonságait (gének kifejeződése, stressz tűrés, differenciációs potenciál), másrészt a különböző differenciált sejtípusok hatékony létrehozásának egyik kulcsa a jó minőségű pluripotens tenyészet.

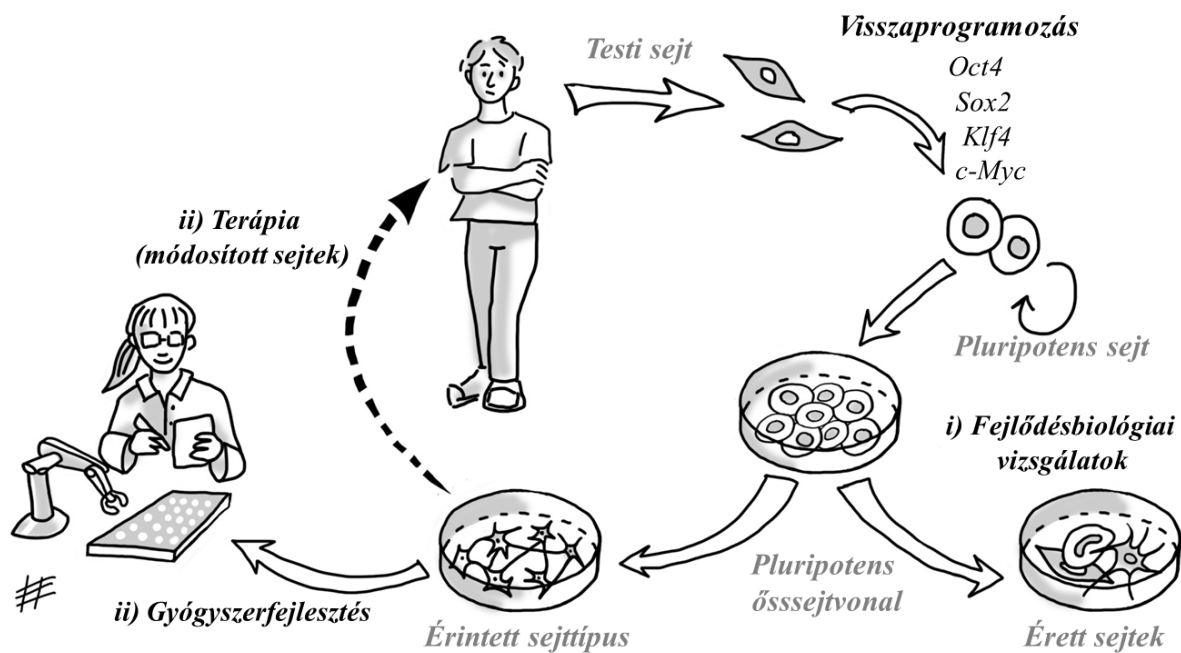
*¹⁶ Bár az elméleti lehetőség fennáll, jelenleg a biztonságos sejtvonalak létrehozása olyan költséggel jár, ami nem teszi lehetővé a technika gyakorlati alkalmazását. Jó néhány új megközelítés létezik a probléma megoldására (őssejt bankok vagy immunológiailag tolerálható univerzális vonalak létrehozása) és várható, hogy a közeljövőben a technika fejlődésével a költségek is drasztikusan csökkenni fognak.

A már említett pluripotencia markerek együttes jelenléte és a spontán differenciációs képesség ellenőrzése általánosan elfogadott és megbízható módszerek a tenyészet pluripotens állapotának ellenőrzésére. Emellett a csíralemezek irányába való differenciációs készséget az ún. teratomaképzéssel is lehet ellenőrizni. Ennél a módszernél a humán pluiipotens őssejteket SCID egerek bőre alá ültetik és az ott keletkezett jóindulatú daganatban (teratoma) vizsgálják a csíralemezekre jellemző sejtípusokat. Mivel ez a módszer állatok feláldozásával jár, kezdenek elterjedni olyan megközelítések is, amelyekben előre gyártott próbák segítségével egyszerre számos pluripotencia illetve csíralemezre jellemző marker meghatározható és a dendogram illetve a főkomponens analízisek alapján megbízhatóan elkülöníthetők a pluripotens állapotú tenyészetek a részlegesen vagy teljesen differenciáltatott sejtektől.

Hosszú távú *in vitro* tenyésztés során a sejtek genetikai állományát (pl. kariotípusát) is folyamatosan tesztelni kell, mivel nem kívánt elváltozások jelenhetnek meg a tenyészetben. Ehhez kapcsolódóan a sejtek passzázsszáma is rendkívül fontos információvá vált (hosszabb tenyésztés után genetikai eltérések jelennek meg az őssejt tenyészetben [31]). A mycoplasma fertőzések kizárása is fontos, mert a tenyészetek szinte minden jellemzőjében (növekedési és differenciációs képesség, plazmamembrán fehérjék kifejeződése stb.) eltéréseket okoznak, ezzel a kísérletek eredményeit megkérdőjelezve, megfertőznek más tenyészeteket és az esetleges állat transzplantációs kísérletekre sem alkalmasak.

1.2.5. A humán pluripotens őssejtek felhasználási lehetőségei

A humán pluripotens őssejtek felhasználása az alap és alkalmazott kutatásban egyre szélesebb területekre terjed ki. Alapvetően három fő irány szerint csoportosíthatjuk a lehetőségeket; (i) szélesebb értelemben vett fejlődésbiológia vizsgálatok (ii) gyógyszerfejlesztés (iii) terápiás célú sejt készítmények előállítása (2. ábra).



2. ábra A hPSC-k felhasználási lehetőségei (Hollebrbach Emil grafikája)

A fejlődésbiológiai vizsgálatok felölelik a humán embrionális fejlődés olyan aspektusait is, amelyek a klasszikus állatmodellekben a fajspecifitások miatt nem vizsgálhatók. Mivel a hPSC-k normál kariotípusú humán sejt vonalak, amelyek képesek a szervezet minden sejt típusát létrehozni, kiválóan alkalmasak a legkülönbözőbb sejtérési folyamatok vizsgálatára és az ehhez kapcsolódó jelátviteli utak feltérképezésére. Mindemellett korlátlan önmegújítási képességük révén nagy áteresztőképességű technikák használatához is megfelelő mennyiségű sejtet lehet belőlük előállítani [32].

A gyógyszerfejlesztések során szintén több lehetőség nyílik a hPSC-k felhasználására. A gyógyszerjelölt molekulák embrió-toxicitásának kiszűrésére már rutinszerűen használnak hPSC alapú rendszereket [33]. Mivel a jelátviteli utak jól vizsgálhatóak az őssejteken vagy az őssejtekből differenciált sejt kultúrákon, gyógyszer támadáspontok kutatására is alkalmazhatók. A kifejlesztett molekulák különböző szervekre (szív, máj, idegsejtek stb.) gyakorolt hatásának/mellékhatásának felmérésére is egyre több őssejt alkalmazási példát találunk [34]. A betegség modellezésben az állatmodellek és a tumoros sejt vonalak mellett egyre nagyobb szerepe van a hPSC-alapú módszereknek. Ha a kiindulási sejt típus nem egészséges, hanem beteg donortól származik, akkor lehetőségünk van visszaprogramozni a beteg sejtjeit pluripotens állapotba. Így a betegségben érintett sejt típusok létrehozásával a betegség kialakulásának, biomarkerek megjelenésének követése és a lehetséges gyógyszerek tesztelése is elvégezhető [35-37].

A hPSC-k megjelenése természetesen magában hordozta a sejt alapú terápiák fejlesztési lehetőségeit is. Ha a „mindentudó” őssejt mindent tud, akkor gyártsunk is belőle olyan

sejttípusokat, amelyek hiányoznak, sérültek vagy nem működnek megfelelően. A hPSC-k korlátlan sejtforrást jelenthetnek a sejtalapú terápiákra és később a szövet-, vagy akár szervpótlások alapjai is lehetnek. Számos klinikai fejlesztés és kipróbálás folyik szerte a világban, de a rutinszerű alkalmazások bevezetése előtt vannak még megoldásra váró problémák [38, 39]. Az egyik első probléma, ami az őssejtek terápiás alkalmazásával kapcsolatban felmerül a biztonságosság kérdése. A terápiás készítményekben maradhatnak pluripotens sejtek, melyekből jóindulatú tumorok, ún. teratomák alakulhatnak ki, emellett a hosszas *in vitro* tenyésztés alatt a sejtek mutációkat szenvedhetnek, amelyek tumoros elváltozásokat okozhatnak. A másik gyakran felmerülő a kérdés az immunológiai összeférhetőség; az autológ sejtek használatának előnyei, hogy személyre szabott terápiás lehetőséget kínálnak, valamint, hogy a beültetett sejtekkel szemben nem alakul ki immunválasz, így nem szükséges a beteget – a gyakran komoly kockázattal járó - immunszuppresszió alávetni. Hátrányuk, hogy az egyedi sejt készítmények előállítása rendkívül költséges és hosszú időt vesz igénybe, ráadásul a minőségbiztosításuk az őssejtvonalak között megfigyelhető különbségek miatt is problémás. Az allogén sejtek előnye, hogy megfelelő biobankokban késztermékként tárolhatók lehetnek, de az immunológiai összeférhetetlenség miatt a kilöködés veszélye még egyező HLA típusok mellett is jelentős. Mind az immunológiai, mind a biztonsági problémák megoldására vannak biztató próbálkozások [40-42]. A sikeres hPSC alapú terápiák megvalósulásához a fent említett problémák megoldása mellett optimalizálni kell például a transzplantációhoz megfelelő érettségi állapotban lévő sejtek előállítását, a sejtek bevitelének idejét és módját, valamint azoknak a betegeknek a kiválasztási kritériumait is, akiknél a legkedvezőbb kimenetele lehet a beavatkozásnak [43]. Ahhoz azonban, hogy ezek a kérdések egyáltalán képbe kerüljenek, először meg kell oldani a hPSC-k hatékony és reprodukálható differenciációját a szükséges sejttípus irányába. A differenciációs módszerekről a következő fejezetben adok rövid áttekintést.

1.2.6. A humán pluripotens őssejtek differenciáltatása

Kezdetben az EB-ken keresztül zajló spontán differenciációs módszert használták különböző sejttípusok előállítására. A zselatinra letapasztott EB-k tovább differenciálódtak és megjelentek morfológiailag jól elkülöníthető sejttípusok; dobogó szívizomtelepek, idegi progenitor sejtekből álló rosetták, sötét pigmentekkel teli, macskakőszerűen elrendeződő epitél sejtek, vagy fibroblaszt-szerű lapos sejtek csoportjai. A kívánt sejttípust eleinte ezekből a spontán differenciálódó kultúrákból nyerték, mechanikus, enzimatis vagy szelekciós eljárásokkal. Közben az egér embrionális fejlődés adatait felhasználva kiderült,

hogy specifikus növekedési faktorok, morfogének és/vagy kismolekulák segítségével a differenciációs folyamatot irányítani tudjuk, ily módon számos sejttípust szelektíven elő lehet állítani. Az így kifejlesztett ún. irányított differenciációs protokollok tipikusan több lépésből állnak, melyek az embrionális fejlődés állapotait követik a megfelelő jelátviteli útvonalak aktiválása vagy épp gátlása révén. A megfelelően differenciált sejteket az adott sejttípus *in vivo* jellemző markereinek kifejeződése és a sejtfunkcióinak megjelenése alapján választjuk el és vizsgáljuk [32]. Az irányított differenciációs protokollok eleinte kétdimenziós kultúrákban valósultak meg, ami a gyógyszeresztelési felhasználásnak jól megfeleltek. Az így létrehozott differenciált sejtek érettsége azonban még hosszabb idő alatt sem érte el az embrionális fejlődés késői szakaszának megfelelő állapotot. A technológia folyamatos fejlődésével megjelentek a háromdimenziós kultúrák, mint a szferoidok (egy sejttípust pl. neurális vagy bél epitél progenitorokat tartalmaznak), az organoidok (a pluripotens őssejtből együtt differenciálódott sejttípusokat tartalmaznak, így pl. a „mini brain” [44, 45] és az asszembloidok, a különböző organoidok – pl. ideg és vázizom - összekapcsolódásából létrejövő bonyolultabb szerveződések [46]. A térbeli elrendeződésnek és a különböző sejttípusok egymásra való hatásának eredményeként ezek már megközelítik a születés körüli sejtérési állapotot [47]. A háromdimenziós kultúrák hatékony funkcionális vizsgálatára azonban még nem állnak rendelkezésünkre megfelelő technikák, így a gyógyszerfejlesztésekhez újabb megközelítések szükségesek. A legújabb fejlesztési irány ezen a téren, hogy ezeket a differenciált sejteket olyan mikrofluidikai eszközökre ún. chip-ekre ültetik, ahol a mikroszkópos technikák jobban alkalmazhatóak és a kezelések hatása is jobban mérhető [48].

Mára szinte minden sejttípusra találunk többé-kevésbé működő differenciációs protokollokat az irodalomban. A klinikailag releváns sejttípusok előállítására hatékony és jól jellemzett differenciációs eljárásokat dolgoztak ki; elsősorban a terápiás eljárások szempontjából fontos sejttípusokra (inzulin termelő B sejtek, pigmentált retina epitél, szívizom vagy a különböző idegi sejttípusok) illetve a gyógyszerfejlesztés és toxikológia szempontjából érdekes sejttípusokra (szív-, máj-, endothel és idegsejt) vonatkozóan.

Laboratóriumunkban elsősorban mezenchimális őssejtek, szívizomsejtek és neurális sejtek létrehozását valósítottuk meg, pluripotens őssejtekből kiindulva. A mezenchimális őssejtek multipotens sejtek, amelyek képesek a kanonikus mezodermális irányokba, így porc-, csont-, és zsír irányba differenciálódni [49], valamint gyulladásgátló, immunmoduláns tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezek a tulajdonságok vonzó célponttá teszik őket terápiás felhasználáshoz, akár a regeneratív sejt pótló tulajdonságukat, akár a gyulladáscsökkentő képességüket használjuk ki. Az először azonosított és jellemzett humán MSC-eket

csontvelőből izolálták [50], számos szövettípusból sikerült izolálni hasonló sejteket, a terápiás megközelítésekhez elsősorban csontvelő, zsír [51] és köldökzsinór [52] eredetű MSC-eket használnak. Amellett, hogy könnyen elérhetőek, laboratóriumi körülmények között korlátozott mértékben szaporíthatók is és stabil genommal rendelkeznek. Így az MSC-k biztonságos sejtforrásként szolgálhatnak autoimmun, gyulladásos, és degeneratív betegségek kezelésében. A mezenchimális őssejtek az izolálás helyétől és az izolálás technikájától függően változó fenotípust mutatnak, ezért a Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy 2006-ban sztenderdizálta azokat a kritériumokat, amelyeknek alapján egy sejtípust mezenchimális őssejtnek lehet nevezni [53]. Habár jelenleg elsősorban felnőtt szövetekből származó MSC-eket használnak kutatásra, fejlesztésre és terápiára (a jelenleg engedélyezett és klinikai kipróbálás alatt álló MSC készítményekről lásd [54]), a különböző donorokból, különböző helyről és különböző szeparálási eljárással létrehozott MSC kultúrák nagyon különbözőek fenotípusukat és funkcionális tulajdonságaikat tekintve. Ezért az MSC-k humán pluripotens őssejtekből történő előállítását kézenfekvőnek tűnt és az évek alatt számos ilyen protokoll látott napvilágot (összefoglalva lásd [55, 56]).

Humán szívizomsejtekre nemcsak a számos és súlyos szívbetegség gyógyításához, hanem a gyógyszerek szívtoxicitás vizsgálatához is nagy szükség lenne. Sajnos a szívizomsejtek (ellentétben például a vér vagy az MSC sejtekkel) regenerációs kapacitása az egyik leggyengébb a szervezetünkben, így nehezen hozzáférhetőek akár kutatási, akár fejlesztési vagy terápiás célokra. Ezen a területen igen nagy szükség lenne megbízható humán modellre. A kardiovaszkuláris betegségek a vezető halálokok szerte a világon, és a már engedélyezett gyógyszerek piacról való visszavonásának a leggyakoribb oka a szívre gyakorolt negatív mellékhatásuk. Mivel a szív az elsőként kifejlődő funkcionáló szerv az embrióban [57], nem meglepő, hogy a humán embrionális őssejtek spontán differenciációja során is megjelennek dobogó szívtelepek [9]. Hogy a spontán differenciáció hatékonyságát emeljék (pl. kokultúra, a szívfejlődésben szerepet játszó citokinek/morfogének használata, kis molekulák és genetikai módosítások bevezetése) és a tenyészeteket más sejtípusoktól mentessé tegyék (pl. metabolikus szelekció, flow citometriás eljárás révén) több megközelítést is sikeresen alkalmaztak (összefoglalva lásd [58]). Mára már olyan közlemények is megjelentek, amelyek a szívizomsejtek különböző típusainak szelektív előállítását célozzák [59]. A hPSC eredetű szívizomsejtek mind expressziós mintázatukat, mind funkciójukat tekintve a magzati, éretlen fenotípust mutatják [58], ennek ellenére a gyógyszeresztelésre sikeresen alkalmazták [60] és a benne rejlő lehetőségeket egyre szélesebb körben kihasználják [61]. Számos eredmény jelent meg különböző

kardiovaszkuláris betegségek modellezésére, elsősorban a monogénes betegségek esetében, és a gyógyszerek kardiotoxicitásának vizsgálatában is [62, 63]. A hPCS-kből gyártott kardiomiociták transzplantációja disznó modellen biztató eredményeket hozott, de emberen klinikai kipróbálás egyelőre nem zajlott le [64].

A központi idegrendszer betegségeinek vizsgálata az egyik legnehezebb feladat; az állatmodellek a fajok közötti eltérés miatt csak megfelelő körültekintéssel vonatkoztathatók az emberre. Bizonyos, elsősorban pszichiátriai jellegű betegségekre nincs is megfelelő állatmodell, és az emberi agy sejtszintű részletei nehezen vizsgálhatók (a képalkotó eljárások a sejtszintű változások leírására nem megfelelőek, a post mortem mintákon pedig a funkciók nem tanulmányozhatók, és csak a betegség végstádiumát tudjuk megfigyelni). A legkomplexebb szervünk megértéséhez is új megközelítést hozott a pluripotens őssejtek felfedezése. Igaz ugyan, hogy sem az agy, sem az egyes területek bonyolult szerkezetét nem tudjuk még laboratóriumi körülmények között modellezni, de a kutatók kitartó munkájának eredményeképpen képesek vagyunk különböző idegsejttípusokat, vagy az organoid technikát felhasználva több sejttípust egyszerre tartalmazó, önszerveződő ún. mini agyat létrehozni [44]. A betegség kialakulását, az ebben szerepet játszó jelpályákat illetve a lehetséges kezeléseket vizsgálhatjuk az ilyen hPSC alapú idegi betegségmodellek segítségével [65, 66]. Terápiás szempontból a különböző progenitor populációk kaptak nagy szerepet. Az érett idegsejtek transzplantációja technikailag is kihívás, és ha sikerül is élő, funkcionális sejteket beadható állapotba hozni, a beépülésük a már meglévő összetett környezetbe kérdéses. Ezzel szemben a progenitorok szaporíthatók, beadásuk és a már meglévő agyterületre való beépülésük is sokkal hatékonyabb. A terület legnagyobb sikere eddig a Parkinson-kór gyógyítására kidolgozott dopaminerg progenitor készítmények létrehozása, amelyek közül több a klinikai kipróbálás engedélyezéséig is eljutott [67].

A gyógyszerfejlesztés szempontjából nem csak az adott sejttípus toxikológiai jellemzői, illetve a normál működését befolyásoló jelátviteli folyamatok érdekesek, hanem azok is, amelyekkel adott betegségeket lehet *in vitro* humán sejtekkel modellezni. Mivel az előzőekben már említettem a betegségmodellezést, a következőkben röviden bemutatom, hogy mit is jelent ez.

1.2.7. A humán pluripotens őssejt alapú betegség modellezés

Ha a pluripotens őssejteket nem egészséges donor sejtjeiből hozzuk létre, akkor lehetőség nyílik arra, hogy az őssejtekből a betegségben érintett sejttípusokat előállítva vizsgáljuk a betegség kialakulását (biomarkereket és lehetséges gyógyszer támadáspontokat keresve),

sejtszintű elváltozásokat (celluláris fenotípusokat) határozzunk meg, és ezeket gyógyszeres vagy más módon (pl. génterápia) javítsuk. A humán embrionális őssejtvonalak létrehozása után röviddel felmerült a lehetőség, hogy a súlyos genetikai betegséget hordozó hólyagcsírákból szintén lehet embrionális őssejtvonalakat létrehozni, amelyekkel a betegség eddig ismeretlen aspektusait lehetne feltárni. Az ilyen betegségek preimplantációs szűrése (például a Down kór vagy a cisztás fibrózis) esetében az lehetséges, ugyanakkor etikai aggályok is felmerültek, így ez a módszer nem terjedt el szélesebb körben [68]. Az indukált pluripotencia felfedezése azután forradalmasította a területet, lehetővé téve, hogy a legkülönbözőbb betegségek esetében, indukált pluripotens vonalak előállításán keresztül, a betegségben érintett sejtípus vagy sejtípusok vizsgálhatóvá váljanak [69-72]. Kontrollként az egészséges családtagok és kor/nem szerint illesztett donorok mintái váltak elfogadottá [73], ugyanakkor a genetikai háttér változatossága miatt több párhuzamos vonalra és nagyobb számú kísérletre van szükség ahhoz, hogy az eredmények szélesebb körű értelmezése, illetve a gyógyításban való alkalmazása megvalósulhasson. Áttörést hozott a területen a genomszerkesztési módszerek (elsősorban a CRISPR/Cas9 rendszer) megjelenése, amely lehetővé tette, hogy irányított mutációkkal ún. izogenikus vonalak legyenek vizsgálhatók; az adott betegre jellemző mutációt ki lehet javítani az iPSC vonalban vagy egy egészséges iPSC vonalban létrehozható a kérdéses mutáció [74]. Így az érdeklődésünk homlokterében álló gén hatása azonos genetikai háttérű sejtekben vizsgálható, ami nagyban segíti a reprodukálhatóságot, csökkenti a ráfordított kísérleti munkát és hatékony módszert ad a betegség kialakulásának és kezelésének felderítéséhez. Mindemellett, az összetett háttérű betegségek (mint például a pszichiátriai kórképek) vizsgálata még manapság is nagy kihívás. A GWAS vizsgálatok alapján szóba jöhető betegségokozó gének száma nagy, hozzájárulásuk a betegség kialakulásához nem tisztázott és a környezeti tényezők hatását sem ismerjük. Ezen a területen az *in vitro* adatok folyamatos gyűjtése és értelmezése vezethet a meghatározó jelpályák/mechanizmusok megismeréséhez, ami a jövőben a hatékonyabb terápiák fejlesztéséhez vezethet. A következő alfejezetben egy olyan betegséget említek röviden, amelynek vizsgálatára a laboratóriumunkban pluripotens őssejt alapú modellrendszert hoztunk létre és amely ebben az értekezésben bemutatásra is kerül.

1.2.8. A Frank Ter Haar szindróma

A Frank Ter Haar szindróma (FTHS) súlyos fejlődési rendellenesség, komplex fenotipikus tünetekkel, mint csontdeformitások (arckoponya-fejlődési rendellenességek széles kutacs és kóros fogazat, kyphosis, megrövidült, hajlított csontok), szívfejlődési rendellenességek,

korai megjelenésű glaukóma, csökkent zsírszövet és meddőség [75]. Családvizsgálatok kimutatták, hogy a FTHS autoszomális-recesszív öröklődési módot mutat és az *SH3PXD2b* gén mindkét alléljában mutációk vannak jelen a betegségben érintett egyéneknél [76]. A *SH3PXD2b* gén a TKS4 vázfehérjét kódolja, ami a jelátviteli utak összekapcsolójaként (hub) működik. A TKS4 részt vesz az EGF-jelátvitelben, szerepet játszik a podoszómaképzésben, és így a rák invázióban is részt vehet. Bár a TKS4 fiziológiai szerepének számos aspektusát már feltárták, a TKS4 szerepe az emberi embrionális fejlődésben és a Frank Ter Haar szindróma kialakulásában még ismeretlen (OMIM:249420). A TKS4-hiányos egerek (TKS4-KO) súlyos, többszervi fenotípussal születnek, hasonlóan az FTHS emberben jelentkező tüneteinek [77]. Figyelemre méltó, hogy az FTHS súlyosan befolyásolja a csontváz csont- és zsírszövet-összetételét, amelyek mindegyike mezenchimális őssejtekből (MSC) származik, ami arra utal, hogy az érintett egyének fejlődése során az MSC differenciációja zavart szenved. A betegség vizsgálatára nem álltak rendelkezésre humán sejtvonalak, a *SH3PXD2b* KO sejtvonalak létrehozása és mezenchimális irányú differenciációjának vizsgálata ezt a hiányt pótolná.

1.3. Az őssejtek funkcionális vizsgálatainak szereplői

Mint azt már kiemeltem, a hPSC-k egyik nagy előnye, hogy funkcionális vizsgálatok végezhetőek rajtuk, illetve a belőlük differenciáltatott sejt típusokon. Ez hozzásegít az emberi fejlődés vagy a betegségek hátterében álló sejtszintű mechanizmusok megértéséhez. Ebben a fejezetben olyan funkcionális vizsgálatokat mutatok be, amelyek a mi munkáinkban is fontos szerepet kaptak.

1.3.1. Az ABC transzporterek

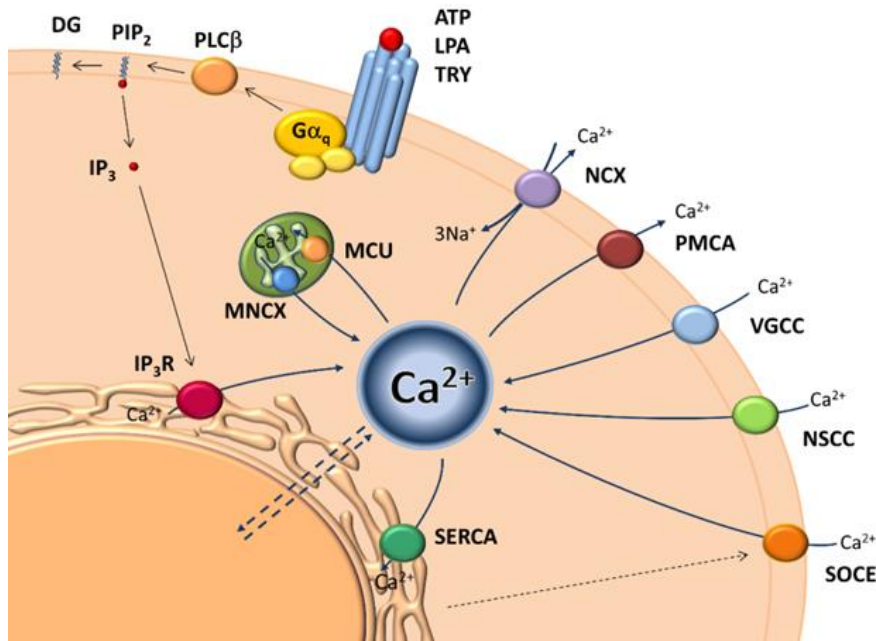
Az ATP kötő kazettát (ATP Binding Cassette) tartalmazó fehérjék az élővilág egyik legnagyobb fehérjecsaládjai. Emberben 48 gént írtak le, szekvenciális és szerkezeti rokonság alapján 7 alcsaládba soroljuk őket, ABCA-tól ABCG-ig (lásd még 1. kiegészítő táblázat). A család legtöbb tagja transzmembrán fehérje (kivételek képeznek az E és F család fehérjéi), amelyek változatos funkciókat töltenek be a plazmamembránba vagy a sejtorganellek membránjaiba ágyazódva [78]. Kiemelkednek a családból a multidrog rezisztencia ABC (MDR-ABC) transzporterek, amelyek számos hidrofób és amfipatikus molekulát képesek eltávolítani a sejteinkből, amihez az ATP bontás energiáját használják. Elsődleges szerepük az olyan szöveti határok védelme, mint a bél, a tüdő, a méhlepény, a vér-agy és a vér-here gát, de részt vesznek a máj méregtelenítő funkciójában és a rákterápiák elleni gyógyszer-rezisztencia kialakulásában is. Az ABC transzporterek széles

és átfedő szubsztrát felismerése hatékony védelmet biztosít a sejtek és szövetek számára a károsító faktorokkal szemben. A xenobiotikum/gyógyszer-rezisztencia, azaz a "kemoimmunitás" három legfontosabb MDR-ABC transzportere a szervezetünkben; az ABCB1 (MDR1/Pgp), ABCC1 (MRP1) és ABCG2 (BCRP/MXR) fehérje [79]. Az érdeklődésünk fókuszába az ABCG2 került, mivel erről a transzporterről leírták, hogy szerepe van a szöveti őssejtek védelmében is [80]. Az ABCG2 fehérje egy fél-transzporter, a sejtekben homodimer formájában látja el a funkcióját, ami az endo- és a xenobiotikumok eltávolítása a sejtekből, beleértve a porfirin-anyagcsere toxikus vegyületeit és a húgysavat is [81, 82]. Érdekes módon egér génkiütéses munkák alapján és funkcionális ABCG2 fehérje nélkül élő emberek (Junior negatív vércsoport – lásd [83, 84]) vizsgálatából tudjuk, hogy ennek a fehérjének a hiánya nem közvetlenül életet fenyegető hatású, de kedvezőtlen környezeti hatások esetében fontos szerepe van a toxinok eltávolításában vagy a köszvény kialakulásában. Az őssejtek életfunkcióinak megértéséhez és így a hatékony terápia tervezéséhez elengedhetetlen, hogy az ABC transzporterek szerepét jobban megismerjük.

1.3.2. Kalcium szignálok

A kalciumion (Ca^{2+}), mint minden sejtben jelenlévő másodlagos hírvivő, nélkülözhetetlen szerepet játszik az alapvető élettani folyamatokban, mint a sejtosztódás, a sejtérés és a sejthalál. A sejtek nyugalmi Ca^{2+} -tartalma 10-100 nM, és egyes folyamatok akkor aktiválódnak, ha ez a szint több száz nM fölé emelkedik. Adódik azonban a kérdés, hogy egyszerűen a Ca^{2+} -koncentráció emelkedése hogyan szabályozhat ennyi folyamatot? A válasz, hogy a Ca^{2+} jelátvitel jellemzői; a sebesség, az amplitúdó illetve a tér- és időbeli mintázat különböző kombinációi különböző sejtszintű válaszokhoz vezetnek [85]. Ezeket a mintázatokat nagyon sok tényező befolyásolhatja (sejttípus, sejt-sejt kapcsolatok, a sejt környezet, stressz hatások stb.), de a jel kiváltásához és a lecsengéséhez vezető folyamatok viszonylag jól feltártak (3. ábra). A citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció megemelkedése, a kalcium-jel, kiváltható indukáló szerekekkel (különböző ligandok, Ca^{2+} pompa gátlók vagy ionofórok használatával), de bizonyos sejtek képesek a Ca^{2+} -szint periodikus változtatására külső jel érkezése nélkül is, amit spontán gradienseknek is szokás nevezni. Ilyen spontán gradiensek jelennek meg a dobogó szívizomsejtekben vagy a spontán aktivitást mutató neuronokban is. A ligand-indukált kalcium jelek közvetíthetnek ioncsatornán keresztül vagy receptorhoz való kötődéssel. A receptor ligand kötése a foszfolipáz C (PLC) aktiválását okozza, amely a foszfolipid fejcsoportoknak a membránhoz kötött diacilglicerinné (DAG) és citoplazmatikus inozitol-trifoszfáttá (IP3) történő hasadását katalizálja. Ez utóbbi az endoplazmás retikulum (ER) membrán IP3 receptoraihoz kötődik,

és ezeknek a nem szelektív kation csatornáknak a megnyílása lehetővé teszi, hogy a Ca^{2+} ionok a koncentráció gradiens mentén kilépjenek az ER lumenből a citoszolba [86]. Az ER kalciumszintjének csökkenése a plazmamembrán Ca^{2+} release-activated (CRAC) csatorna aktivációs jeleként szolgál, ami további kalcium beáramlását okoz az extracelluláris térből [87]. A megnövekedett citoplazmatikus Ca^{2+} szintet ezt követően több mechanizmus is visszaállíthatja, ami a kalcium jel lecsengéséhez vezet. A legtöbb sejtben a szarko/endoplazmatikus retikulum Ca^{2+} ATP-áz (SERCA) és a plazmamembrán Ca^{2+} ATP-áz (PMCA) felelős a Ca^{2+} citoplazmából az ER-be, illetve az extracelluláris térbe történő pumpálásáért [88]. A plazmamembránon keresztül további lehetőségek nyílnak a Ca^{2+} szint változtatására; a $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő (exchanger- NCX) [89], a nem szelektív kationáram- (NSCC) [90] és a feszültségfüggő Ca^{2+} -csatornák (VGCC) [91] a legfontosabb szereplői ezeknek a folyamatoknak. A citoplazma Ca^{2+} szintjét a mitokondriumok is szabályozzák a mitokondriális kalcium uniporter (MCU) [92] és a mitokondriális $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ kicserélő (exchanger- MNCX) [93] révén. A Ca^{2+} szabadon diffundál a citoplazma és a sejtmag között a nukleáris pórus komplexeken keresztül, ami további lehetőséget nyújt a sejtnak a Ca^{2+} közvetített válaszok kialakításában [94]. Ennek a számos szereplővel rendelkező rendszernek az összehangolt működése szabja meg, hogy a sejt hogyan reagál a külső vagy belső jelekre. A különböző sejtek változatos receptor, ioncsatorna, exchanger és pumpa készlettel rendelkeznek, és ettől függően reagálnak a szignálokra. A sejtválaszt a kalcium jelek nagysága és periodicitása is befolyásolja. A rendszer bonyolult ugyan, de a sejten belüli Ca^{2+} szint mérésére kiváló módszereink vannak, amelyek segítenek a sejten belüli jelátviteli folyamatok felderítésében, és jól jelezhetik a későbbi sejtválaszt (mint a szív dobogása, az idegsejtek aktivitása vagy a sejthalál folyamata), ezért a gyógyszervizsgálatokban is gyakori, hogy kalcium jelet kimenő jelként használják. Így az őssejteken és differenciált származékaikon való mérés technikájának kidolgozása az őssejtek és differenciált származékaik alapvető fiziológiai vizsgálatára és később a gyógyszerfejlesztésben való felhasználására is alkalmazható lesz.



3. ábra A citoplazmatikus kalciumszint szabályozása (Berecz Tünde ábrája- leírást lásd a szövegben)

1.3.3. A citoplazmatikus Ca^{2+} koncentráció mérésének technikái

A kalcium jelátviteli utak vizsgálatára jelenleg legszélesebb körben a fluoreszcens indikátorokat képalkotó módszerekkel kombináló technikák terjedtek el, amelyek a fiziológiás sejtfunciók minimális zavarásával teszik lehetővé a méréseket. Az alkalmazott eljárások a fluoreszcens mikroszkópia, áramlási citometria, konfokális és kétfoton mikroszkópos technikák széles skáláját foglalják magukban, mindezen módszerek alapja a fluoreszcens kalcium indikátorok élő sejtekbe juttatása.

A kismolekulás, sejt permeábilis, szintetikus kalcium indikátorok alkalmazása áttörést hozott a kalcium jelátvitel vizsgálatában (lásd [95-97]). Ezeket a kalciumérzékeny festékeket széles körben alkalmazták és használják ma is *in vitro/ ex vivo* kalcium jelátviteli vizsgálatokban. Alkalmazásuknak azonban számos hátránya is van; a sejtek festékkel való töltése speciális körülményeket igényel (szérum-mentes közeg, mosási lépések, ABC transzporterek gátlása stb.), és sok esetben a sejtmembránon átjutó, nem fluoreszcens származék (pl. acetoxi metilészter - AM) fluoreszcens kalcium indikátor festékké alakulása a sejtben toxikus metabolitokat eredményez. Mivel ezek a festékek kalcium pufferként is viselkednek, az intracelluláris festék felhalmozódás jelentősen megváltoztathatja a jelátvitelt. A töltési eljárás reprodukálhatósága és a festék egyenetlen eloszlása a sejtek között és/vagy a sejtben belül komoly problémákat okozhat. Ezenkívül a festék kioltódása (quenching) és/vagy fotoelhalványodása (photobleaching) előfordulhat

hosszabb mérések során (a részletekért lásd [98, 99]). Ezeknek a festékeknek az *in vivo* alkalmazása is erősen korlátozott. A legjobban jellemzett, legszélesebb körben és legsikeresebben alkalmazott kalciumindikátorok a Fluo-3 és Fluo-4 festékek [100, 101]. Méréseink során gyakran mi is a Fluo-4 festéket használtuk.

A genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék számos ilyen korlátot kezelnek, és a kalcium érzékeny festékek alternatívájaként szolgálnak a jelátviteli folyamatok vizsgálatában. Fejlesztésük különböző optikai tulajdonságokkal rendelkező indikátorok sorát eredményezte [102, 103]. A szövetspecifikus promóterek használatával a kiválasztott szövetekben vagy sejttípusokban, míg a szelektíven, egy adott sejtorganellumba való irányítással adott intracelluláris kompartmentekben vált lehetővé a kalcium szignálok tanulmányozása [104-107]. Körültekintően megválasztott expressziós körülmények között a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék minimális hatást gyakorolnak a sejt működésére, *in vivo* is használhatók, ezért hosszú távú vizsgálatokra is alkalmasak [3], bár a kalcium-puffereles és jelátvitel megváltozása továbbra is előfordulhat [2, 108].

Összefoglalva, a kalcium érzékeny kismolekulás festékek számos előnnyel rendelkeznek a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjékkel szemben, beleértve a gyorsabb és közel lineáris válaszokat és a nagyobb érzékenységet [109]. Ezzel szemben a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék jobban alkalmazhatóak specifikus sejttípusokban vagy adott sejt-kompartimentekben való vizsgálatokra, hosszú távú méréseket tesznek lehetővé, és jobb jel-zaj arányt mutatnak, legalábbis *in vivo* kísérletekben [109]. A genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék közelmúltbeli fejlesztése az indikátorfehérjék egy új osztályát eredményezte, beleértve a GCaMP6-ot is, amely nagyobb érzékenységgel és nagyobb detektálási megbízhatósággal rendelkezik még az egyes neuronok akciós potenciáljainak esetében is [110]. Így az aktuális tudományos kérdéstől függően a kutatóknak az adott kérdéshez legmegfelelőbb indikátor(oka)t kell kiválasztaniuk, figyelembe véve a jel kinetikáját, az indikátor érzékenységét, a jel-zaj arányt és a kísérleti célok egyéb szempontjait. Míg a hPSC-ből létrehozott sejteket és szöveteket széles körben használják a kalcium jelátviteli vizsgálatokhoz, addig csak korlátozott számú adatot találtunk pluripotens őssejtek kalcium jelátviteléről. Az adatok nagyrészt egér modellen történt vizsgálatokból származnak [111-113]. Hogy a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék alkalmazhatóságát megismerjük a pluripotens őssejtekben, differenciáció közben és differenciálódott formáikon, munkáinkban többféle konstrukcióban hasonlítottuk össze a genetikailag tervezett kalcium indikátorokat és a klasszikus fluoreszcens kalcium indikátorokat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésben az alábbi célkitűzésekhez kapcsolódó munkáinkról számolok be részletesebben:

I. Humán pluripotens őssejtek létrehozása sejtbiológiai vizsgálatok és betegségmodellezés céljából (Szabó et al. Stem Cell Res. 2020)

II. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és funkcionális vizsgálata

1. Feltérképezni, hogy milyen multidrog transzporterek működnek a pluripotens őssejteken. (Apáti et al. BBA 2008 és Sarkadi et al. Stem Cells. 2010)

2. Vizsgálni, hogy, hogyan változik a multidrog transzporterek kifejeződése a szöveti differenciáció kezdetén. (Erdei et al. Cytometry B Clin Cytom. 2014)

3. Milyen stressz körülmények között nyújtanak védelmet az ABC transzporterek? (Erdei et al. Eur Biophys J. 2013)

4. Használható-e ez a tudás drog rezisztens szövetek tervezésében? (Erdei et al. PLoS One. 2018)

5. Felderíteni, hogy, milyen a pluripotens őssejtek kalcium szignalizációja és milyen módszerekkel érdemes ezt vizsgálni? (Apáti et al. Mol Cell Endocrinol. 2012 és Apáti et al. Cell Signal. 2013)

6. A pluripotens őssejt-eredetű neurális sejtek kalcium jeleinek vizsgálata (Vőfély et al. Mol Cell Neurosci. 2018)

III. Pluripotens őssejtek alkalmazása

1. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek jellemzőinek és felhasználási lehetőségeinek vizsgálata (Varga et al. BBRC 2011)

2. Pluripotens őssejt alapú betegségmodell létrehozása (László et al. Int J Mol Sci. 2022)

3. MÓDSZEREK

Értekezésem célja az őssejtkutatással kapcsolatos eredményeim bemutatása, ezért az alkalmazott módszerekről jelen dolgozatban csak rövid leírást adok. A módszerek részletes leírása megtalálható a csatolt cikkekben, illetve azokban a metodológiai közleményekben, amelyekben ezeket lépésről lépésre leírtuk és itt csak hivatkozom rájuk.

3.1 Őssejtvonalak tenyésztése és differenciáltatása

3.1.1. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és tenyésztése

A humán embrionális őssejtvonalakat részben Douglas Melton (Harvard Egyetem) laboratóriumából kaptuk (HUES1, HUES3, HUES4, HUES9), részben az ATCC cégtől vásároltuk (BG01V). Kutatásainkat az Egészségügyi Tudományos Tanács, Humán Reprodukciós Bizottság, ETT HRB 6681/2012-HER engedélye alapján végeztük. A sejtvonalakat Mitomycin-C-vel (Sigma) osztódásgátolt egér embrionális fibroblaszt sejteken (MEF/CF1) (Merk Millipore) vagy autogén (MSC1) dajkasejteken tenyésztettük. A tápfolyadék összetétele: 15% Knockout Serum Replacement (Life Technologies), 80% Knockout Dulbecco Modified Eagle Medium – Ko-DMEM (Life Technologies), 1 mM Glutamax-I (Life Technologies), 0,1 mM β -mercaptoetanol, 1% nem-esszenciális aminosav és 4 ng/mL humán fibroblaszt növekedési faktor -2 (FGF2) (Invitrogen). Az átültetést tripszin vagy kollagenáz enzimmal végeztük.

Az általunk létrehozott indukált pluripotens őssejtvonalak esetében a donorok perifériás vérmintáiból mononukleáris frakciót (PBMC) izoláltunk és a sejtek transzdukcióját a CytoTune – iPS 2.0 Sendai Reprogramming Kit (Thermo-Fisher Scientific) segítségével végeztük a gyártó protokollja alapján (részletesen lásd [114]). A megjelenő őssejtcsomókat MEF-en tenyésztettük tovább, majd a 10. passzálást követően az iPSC-ket elkezdtük dajkasejtmentes körülmények között tenyészteni. Amihez a tenyésztőlemezeket Matrigel®-lel (Corning) vontuk be és a sejteket mTeSR médiumban (STEMCELL Technologies) tartottuk fent. A passzálást Accutase (Thermo-Fisher Scientific) vagy ReLeSR (STEMCELL Technologies) segítségével végeztük.

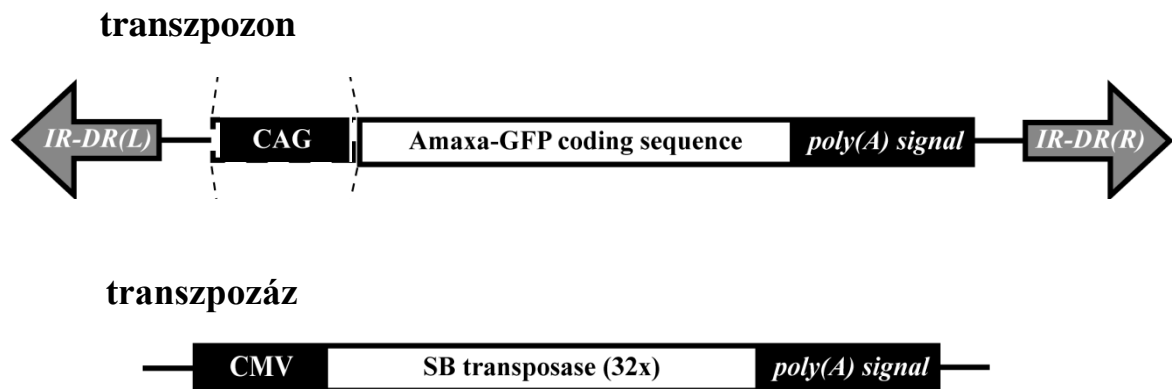
Az UV-C fénykezeléseknél, a hidrogén-peroxid kezeléseknél és az áramlási citométerrel történő szétválogatás után a sejtek növekedését követő kísérletekben szintén dajkasejtmentes körülmények között tartottuk. A sejteket 25-40 passzázs között használtuk az ABCG2 heterogenitás és a stressz hatások vizsgálatánál.

A neurális progenitorok létrehozásához egy olyan iPSC vonalból indultunk ki, amelyet Fred Gage (Salk Institute) laboratóriumában állítottak elő (62F).

A hPS sejteken a megfelelő tápfolyadékot naponta cseréltük és a sejteket 5% CO₂ és 90% páratartalom mellett 37°C-on tenyésztettük.

3.1.2. Humán pluripotens őssejtvonalak transzfekciója

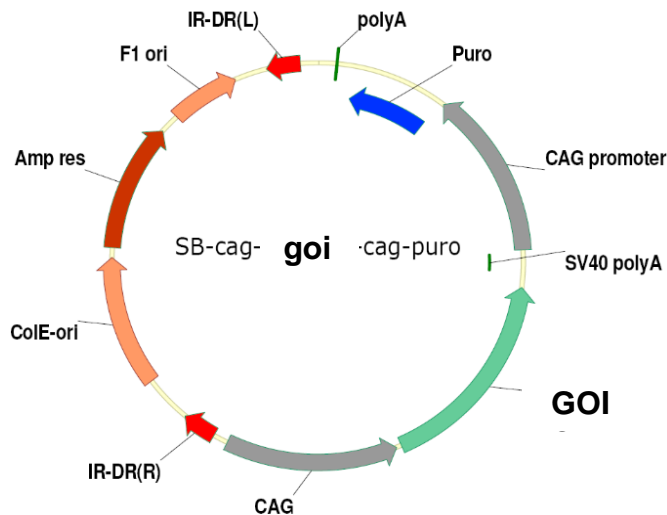
A pluripotens őssejtekbe a különböző transzgéneket a Sleeping Beauty (SB - Csipkerózsika) transzpozon alapú rendszer segítségével vittük be (PMID: 10964563) [115]. Ezzel a módszerrel sikerült a transzgénnek stabil integrációját elérni és a sejtek pluripotens állapota illetve differenciálódási képessége is megőrizhető volt. A transzpozáz vektoron citomegalovírus (CMV) promótert használtunk, mivel ezt a promótert a pluripotens őssejtek pár nap alatt csendesítik. A transzgén beépüléséhez elég ez a pár nap és ezzel elkerülhető, hogy a transzpozáz spontán beépülése esetén a transzgén esetleg kivágódjon vagy transzpozáz mutációkat generáljon. A transzgének bevitelére alkalmas transzpozon vektorba egy mesterséges, általános promótert (CAG) használtunk, amiről őssejtekben is megmutattuk, hogy mind a pluripotens állapotban, mind a differenciált származékokban megfelelő expressziót biztosít a transzgénnek (PMID: 19415778) [116]. Egy ilyen általános elrendezést a 4. ábrán mutatok be.



4. ábra A transzgén bevitelre használt transzpozon (az Amaxa-GFP példáján bemutatva) és SB-transzpozáz expresszáló plazmidok szerkezete. A transzpozon konstrukciók a CAG, míg a transzpozáz csak átmenetileg expresszáló CMV-promótert tartalmazzák. IRDR-(L)/(R) – bal és jobb oldali fordított ismétlődő direkt ismétlődő SB transzpozon szekvenciák; poliA: poliadenilációs szekvenciák.

A transzfekcióhoz lipofectamin alapú eljárást használtunk (FuGENE[®]6/Roche Applied Science), majd a hatékonyság emelése miatt a pluripotens sejtek esetében váltottunk a nukleofekciós módszerre. Jelenleg az Amaxa Nucleofector A-23 programja a Human Stem Cell Nucleofector[™] Kit-ettel (Lonza) a leghatékonyabb, rutinszerűen ezt használjuk a

laboratóriumban. A következő ábrán az itt bemutatott munkákhoz felhasznált plazmidok sémáját mutatom be (5. ábra). A választott transzgén mellett általában antibiotikum szelekciós gént is beviszünk, hogy a szelekcióval megnöveljük a sikeresen transzfektált sejtek arányát.



5. ábra – Az SB transzpozon vektorok sémája. A transzpozon kazetta egy puromicin rezisztencia gén expressziós egységet is tartalmaz, amely lehetővé teszi az integrált transzpozont tartalmazó sejtek feldúsítását. GOI (gene of interest) - a transzgén, ami a mi esetünkben a GFPABCG2 fúziós gén, a GCaMP2 és GCaMP6fast géneket jelöli; IRDR-(L)/(R) – bal és jobb oldali fordított ismétlődő direkt ismétlődő SB transzpozon szekvenciák; Puro – puromicin rezisztencia gén; Amp res – ampicillin rezisztencia gén; F1 ori / ColE-ori: bakteriális replikációs origó; poliA: poliadenilációs szekvenciák.

3.1.3. Humán pluripotens össejtvonalak differenciáltatása

A spontán differenciációs kísérleteknél a sejteket MEF dajkasejt rétegen tenyésztettük és a kísérletek megkezdése előtt a passzálást Kollagenáz-IV (Gibco) enzimmal végeztük. A sejteket ezután 20% FBS-t tartalmazó D-MEM (MEF médium) tápfolyadékban ultra alacsony tapadási felületű (ULA) tenyésztő edényben tartottuk, ahol egymáshoz tapadva 3 dimenziós struktúrákat, EB-eket hoznak létre. A 7. napon zselatinnal fedett tenyésztőfelületre tettük ki az EB-eket, ahol azok letapadtak. Ezt követően a MEF médiumot kétnaponta cseréltük. A differenciációs markerek megjelenését a letapadást követő 6. napon vizsgáltuk. A spontán differenciációval keletkező sejtípusok további vizsgálatokor mechanikus (szívizom és neurális progenitorok) vagy enzimátikus elválasztást (MSCI) alkalmaztunk.

Az MSCI sejtek létrehozásához a spontán differenciáció 12. napját követően addig tenyésztettük, amíg a letapadt EB-k körül kiterjedt fibroblaszt-szerű sejtréteg jelent meg (20-30 nap). Ezt a sejtréteget tripszinnel felszedtük és visszaültettük zselatinnal fedett

felületre. A tripszines átültetést addig folytattuk, amíg többségében csak fibroblaszt-jellegű sejtek maradtak a tenyészetben. A 3-4 passzálást követően a sejttenyészet „kitisztult” és olyan homogén sejtvonalat kaptunk, mely legalább 20 passzázson keresztül fenntartható volt, és MSC-szerű tulajdonságokkal rendelkezett [117, 118].

Neurális progenitor és idegsejt tenyészeteket iPSC vonalból kiindulva Yu és munkatársai által leírt differenciációs protokoll alkalmazásával hoztunk létre [119]. Az NPC-eket 6. és a 18. passzázs között, míg az érett neurális tenyészeteket a neurális differenciáció 4-5. hetében vizsgáltuk.

3.1.4. Humán pluripotens őssejtek és differenciáltatott származékaik jellemzése

A morfológiai megfigyelés mellett mRNS szintek mérésével és immuncitokémiai eljárásokkal jellemezzük a tenyészeteket. A kariotípus és a mycoplasma mentesség ellenőrzése is elengedhetetlen a minőség biztosítására.

RT-PCR elemzés

A teljes RNS-t TriFast reagenssel (Peqlab Ltd.) izoláltuk a gyártó utasításait követve. A cDNS-mintákat 1 µg össz-RNS-ből készítettünk a Promega Reverse Transcription System Kit (Promega) segítségével, a gyártó előírásai szerint. A valós idejű kvantitatív PCR-hez (RT-PCR) Pre-Developed TaqMan® tesztekét vásároltunk (Thermo Fisher Scientific). Endogén kontrollként RPLP0 riboszomális fehérjét használtunk (2. táblázat). Az RT-PCR elemzéseket StepOnePlus™ Real-Time PCR rendszerben (Thermo Fisher Scientific) végeztük. A relatív mRNS szinteket a 2^{-ΔCt} módszerrel számítottuk ki.

Immuncitokémiai festés

Az immunfluoreszcens festéshez a sejteket nyolcelykű kamrákban tenyésztettük és az ábrákon jelzett napokon 4%-os paraformaldehiddel (Thermo Fisher Scientific) fixáltuk 15 percig szobahőmérsékleten. DPBS-s mosás után a mintákat 1 órán át szobahőmérsékleten blokkoltuk DPBS-ben, amely 2 mg/ml szarvasmarha szérumalbumint (BSA-Sigma), 1% hidegvízi halbőről származó zselatint (Sigma), 0,1% Triton-× 100-at (Sigma) 5% kecskeszérummal (Sigma) vagy a nélkül, az elsődleges antitestektől függően (2. táblázat). A mintákat ezután 1 órán át szobahőmérsékleten vagy egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk az elsődleges antitestekkel. Amennyiben szükséges volt, a DPBS-sel történő mosás után a sejteket 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk Alexa Fluor 488 vagy Alexa Fluor 547 festékekhez konjugált IgG másodlagos antitestekkel (Thermo Fisher Scientific). A sejtmagokat DAPI-val (Thermo Fisher Scientific) festettük.

2. táblázat A leggyakrabban használt ellenanyagok és primerek összefoglaló táblázata

Ellenanyagok az immuncitokémiai/flow-citometriás vizsgálatokhoz			
	Ellenanyag	hígítás	Cég Katalógus szám
Pluripotencia marker	Mouse anti-Oct3/4	1:50	Santa Cruz Biotechnology Cat# sc-5279; RRID:AB_628051
	Goat anti-Nanog	1:100	R and D Systems Cat# AF1997; RRID:AB_355097
	Mouse anti-SSEA4-PE/APC	1:50	R and D Systems Cat# MAB1435 RRID: AB_357038
	Mouse anti-ABCG2(5D3)	1:125	BD Biosciences Cat#561180
MSC markerek	PE Mouse Anti-Human CD73	1:100	BD Pharmingen™ Cat# 550257
	PE Mouse Anti-Human CD90	1:100	BD Pharmingen™ Cat# 561970
	FITC Mouse Anti-Human CD44	1:100	BD Pharmingen™ Cat# 555478
Endoderm marker	Mouse anti-AFP	1:500	Sigma-Aldrich Cat# A8452; RRID:AB_258392
Mezoderm marker	Mouse anti-SMA	1:100	Abcam Cat# ab7817; RRID:AB_262054
Ektoderm marker	Mouse anti-β-III-Tubulin	1:2000	R and D Systems Cat# MAB1195; RRID:AB_357520
Másodlagos ellenanyag	Goat-Anti-Mouse (H+L) Antibody, Alexa Fluor 488	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11029; RRID:AB_2534088
	Donkey-Anti-Goat (H+L) Antibody, Alexa Fluor 488	1:250	Thermo Fisher Scientific Cat# A-11055; RRID:AB_2534102
Primerek az mRNS expressziós vizsgálatokhoz			
Pluripotencia markerek (qPCR)	NANOG	Hs02387400_g1 (Thermo Fisher Scientific)	
	OCT4	Hs00999632_g1 (Thermo Fisher Scientific)	
Endoderm differenciáció markere (qPCR)	AFP	Hs00173490_m1 (Thermo Fisher Scientific)	
Mezoderm differenciáció markere (qPCR)	T-BRY	Hs00610080_m1 (Thermo Fisher Scientific)	
Ektoderm differenciáció markere (qPCR)	PAX6	Hs00240871_m1 (Thermo Fisher Scientific)	
Háztartási gén (qPCR)	RLP0	Hs99999902_m1 (Thermo Fisher Scientific)	

Kariotípus elemzések

Az elemzéseket a standard G-sávozási technika alkalmazásával az UD-GENOMED Medical Genomic Technologies Ltd. (Debrecen/Magyarország) végezte.

Mycoplasma kimutatása

A mycoplasma kimutatását MyxoAlert™ Mycoplasma Detection Kit (Lonza) segítségével végeztük a gyártó utasításai szerint.

3.2. Humán pluripotens őssejtek és differenciáltatott származékaik funkcionális jellemzése

3.2.1. Hoechst 33342 felvétel

Az ABCG2 funkciójának vizsgálatához a Hoechst 33342 festék (Invitrogen) kipumpálásának a sebességét mértük. Ezt a festéket mind az ABCB1, mind az ABCG2 fehérje kipumpálja, ezért a méréseknél az ABCG2 szelektív gátlószerét (Ko143 1 μ M-os koncentrációban) alkalmaztuk, hogy az ABCG2-függő hatást vizsgálhassuk. A hES sejtek ABCG2 expressziója heterogén ezért a nem megfelelő konklúzió levonásának elkerülése érdekében a mérést valós idejű konfokális mikroszkópos módszerrel végeztük. Az élősejtes mintákhoz 1 μ M Hoechst festéket adtunk, majd folyamatosan monitorozva a festékfelvételt, 120 másodperc inkubációs időt követően 1 μ M Ko143-at adtunk a médiumhoz. Ezt követően fixáltuk a mintákat, és az ABCG2 transzporter expresszióját *in situ* immunfestéssel tettük láthatóvá. A mérés értékelésénél a festékfelvételt a transzportert kifejező, illetve nem expresszáló sejtek esetében külön-külön vizsgáltuk. A MAF (multidrog rezisztencia aktivitási faktor) értékét a steady-state fluoreszcencia akkumuláció mértékéből határoztuk meg a Ko143 adása előtt (F), illetve után (F*): $MAF=(F^*-F)/F^*$.

3.2.2. Kalcium jelek vizsgálata

A kalcium szignalizáció vizsgálatáról írtunk egy részletes metodikai cikket, amelyben lépésről-lépésre bemutatjuk a vizsgálati és értékelési módszereket [120]. Ezért itt ezt nem ismételtem meg, de a konkrét mérések leírásánál részletesebb ábraalírásokkal igyekeztem a megértést segíteni.

3.2.3. Invadopodia vizsgálat

A mezenchimális őssejtek (Merck-ECM670) ECM degradációs potenciáljának vizsgálatára QCM zselatin invadopodia vizsgálatot használtunk a gyártó ajánlása alapján.

3.2.4. Statisztikai módszerek

A vonatkozó adatok (biológiai/technikai párhuzamosok száma, statisztikai módszer, szignifikancia érték) az adott mérések ábraalírásában található.

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

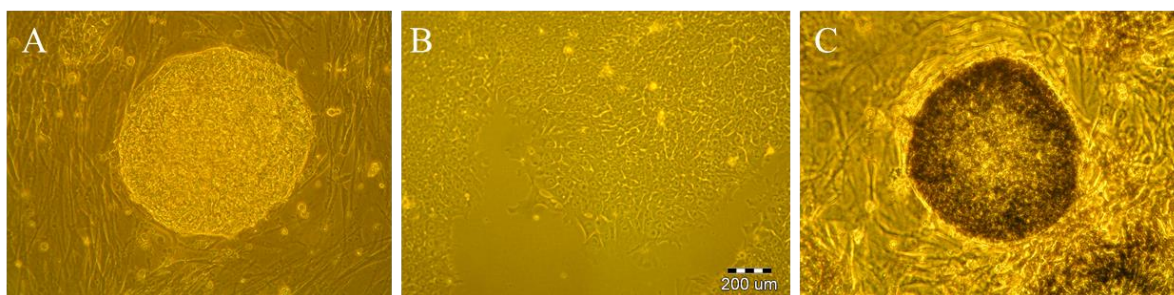
4.1. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és jellemzése

(vonatkozó fontosabb közlemény: Szabó et al. Stem Cell Res. 2020)

A laboratóriumunkban több vonalat tartunk fenn, hoztunk létre és használunk a különböző kísérleteink során. Új, humán pluripotens őssejtvonalakat rutinszerűen kétféle módon hozunk létre a laboratóriumunkban; (i) a meglévő vonalak genetikai módosításával (i/a) különböző fehérjék overexpressziója [116, 121-124] vagy (i/b) mutációk bevitele/kijavítása révén [125, 126], (ii) illetve szöveti sejtek visszaprogramozásával (általában vérsejtekből Sendai vírus és a négy Yamanaka faktor segítségével) [127-130].

A tenyésztésben lévő pluripotens őssejtvonalak minőségét rendszeresen ellenőrizni kell, mert a kiindulási sejtek minősége nagyban befolyásolja a kísérletek kimenetelét (mint említettem a szuboptimális körülmények részleges differenciációt és inhomogenitást okoznak). Ezeket a vizsgálatokat minden újonnan létrehozott vonal estében is elvégezzük, amit most egy kiválasztott példán mutatok be [130]. A későbbiekben tárgyalt cikkeknel csak akkor térek ki erre, ha a gondolatmenet ezt megkívánja. Az itt bemutatott példában egy egypetűjű ikerpár (66 éves, II típusú diabétesssel diagnosztizált nőbetegek) perifériás vérmintáiból kinyert mononukleáris sejtjeit programoztuk vissza a négy Yamanaka faktor Sendai vírussal történő kifejezésével.

Először is lássuk, hogyan néznek ki az őssejtek a leggyakrabban alkalmazott tenyésztési körülmények között (6. ábra).



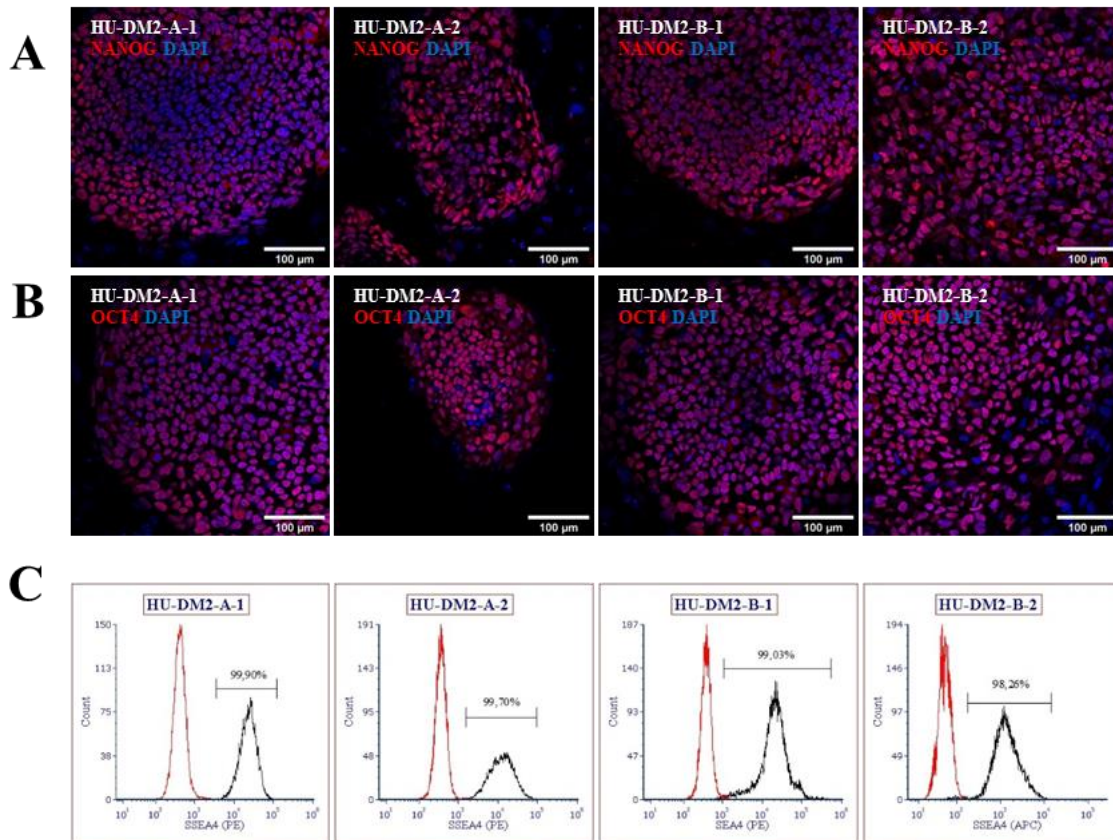
6.ábra A pluripotens állapotra jellemző morfológia és az alkalikus foszfatáz (AP) festődés (A) HUES9 embrionális őssejt egér dajkasejten (B) HUES9 embrionális őssejt Matrigél extracelluláris mátrixon (C) HUES9 embrionális őssejt AP festése egér dajkasejten.

A pluripotens őssejteket osztódásgátolt egér embrionális fibroblaszton (egér dajkasejteken-MEF) tenyésztve tipikus, szoros illeszkedésű sejtcsomókban nőnek (6.A ábra). A sejtek átültetésekor (passzálás) is ilyen egymáshoz tapadó kisebb csomókban (clump) kerülnek át az új tenyésztési felületre (ami a sejtszám meghatározást igen megnehezíti). Ezt a tenyésztési módot alkalmazták először a hPS sejt vonalak létrehozására

és a mai napig a sztenderd eljárás (a sejt vonal alapítás a mai napig ilyen körülmények között zajlik a laboratóriumunkban, mert ezzel a technikával tudjuk a leghatékonyabban stabilizálni a Sendai vírussal létrehozott vonalainkat). Idővel megjelentek a dajkasejtmentes tenyésztési technikák, amelyeknél két új fejlesztést alkalmazunk; a felületet az őssejteknek megfelelő extracelluláris mátrixsal fedjük (leghatékonyabb a Matrigel) és a sejtek passzálásakor Rho kináz inhibitor (Rocki) használunk. Az extracelluláris mátrix pótolja az egér dajkasejtek által termelt mátrixot, a Rocki pedig elősegíti a sejtek egysejtes állapotban való túlélését (az őssejtek enélkül nagyon kis eséllyel élnek túl az egysejtes állapotot, ami a klónozást ennek a tenyésztési módszernek a megjelenése előtt heroikus tette). Az extracelluláris mátrixon tenyésztett őssejtek még mindig összetapadva, de kevésbé szoros sejtsomókban nőnek (6.B ábra). A képen jól látszanak az egyedi sejtek, a jellemző nagy sejt-maggal és kis citoplazmával, illetve a magban jól elkülönülő sejt-magvacskákkal. A 6.C ábrán a hPSC-kre jellemzően magas aktivitású alkalikus foszfatáz enzim működését bizonyítjuk egy erre kifejlesztett színes szubsztrát segítségével. A sejtek átültetésekor a tenyésztésnek és a céljainknak megfelelő eljárást lehet alkalmazni; egér dajkasejtekről tripszin vagy kollagenáz enzimekkel a leggyakoribb az átültetés, míg a monolayeres tenyészteteket accutáz enzimmel vagy a sejt-sejt kapcsolatokat megbontó vegyületek (elsősorban a külső kalcium megkötésére alkalmas EGTA) alkalmazásával oldjuk meg. A hPSC-ket naponta kell tápfolyadékkal etetni (ami folyamatos munkabeosztást jelent) és át kell ültetni mielőtt túlnőné a tenyésztet. A médiumok az évek során folyamatosan fejlődnek, egyre jobban kiküszöbölik az állati termékeket és sztenderdizálják az összetételüket. Mára már olyan magas minőségű és szigorúan ellenőrzött médiumok is elérhetők, amelyek lehetővé teszik emberi terápiára alkalmas őssejt készítmények előállítását. Ha az őssejtjeink morfológiailag megfelelőnek tűnnek, további vizsgálatokkal szükséges bizonyítani a pluripotens állapotot. Ezek közül az egyik a pluripotencia markerek kimutatása.

A pluripotencia markerek közül a leggyakrabban használtak a „core” transzkripció faktorok; a POU domain, class 5, transcription factor 1 (*POU5F1*) gén által kódolt **OCT4**, valamint a SRY (sex determining region Y)-box 2 (**SOX2**) és a homeobox **NANOG** gének kifejeződését szokták bemutatni mRNS (RT-PCR technikával) és fehérje szinten (immunfestéssel) is. A populáció homogenitásának bemutatására a felszíni markerek; a Stage-specific embryonic antigen 3 és 4 (SSEA3/ és 4) illetve a Podocalyxin Like (PODXL) termékeinek epitópjaira specifikus markerek, a TRA-1-60 és TRA-181 áramlási citometriás elemzését használják. Ezekre a felszíni markerekre a populáció több mint 90%-ának pozitívnak kell lennie pluripotens állapotban. Az 7. A és B ábrán négy általunk

létrehozott iPSC vonal Nanog és Oct4 festését mutatom be. Az össejtcsomók egységesen festődnek mindkét markerre. Az 7.C panel ugyanezen klónok SSEA4 áramlási citometriás elemzését mutatja, amelyen jól látszik, hogy az össejttenyészetben szinte minden sejt (98,2 és 99,9% közötti értékek) felszínén megjelenik ez a marker.



7. ábra A pluripotencia markerek vizsgálata (A-B) A jellemző transzkripciós faktorok NANOG és Oct4 (piros) immunfestése. A magokat DAPI-val festettük (kék). (C) SSEA4-PE (fekete görbe) ellenanyaggal jelölt iPSC kultúrák áramlási citometriás mérése. A piros görbék az izotípus jelölést mutatják, a kapuzás ennek alapján történt.

Az alkalikus foszfatáz aktivitás és a pluripotencia markerek együttes jelenléte azonban még nem elég, hogy a sejtvonalainkat pluripotensnek tekinthessük, mert differenciációs képességüket is meg kell vizsgálnunk. A pluripotencia fenntartását elősegítő faktorok hiányában a sejtek spontán módon differenciálódni kezdenek, és mindhárom csírvonalhoz tartozó differenciált sejtípusok jelennek meg a tenyészetekben (PMID: 10859025) [8]. A legelterjedtebb módszer a spontán differenciáció vizsgálatára az embriótest (EB) képezésen keresztül valósul meg. Ha a pluripotens állapot fenntartása érdekében dajkasejten vagy extracelluláris mátrixon tenyésztett hPSC-eket szuszpenziós kultúrában és szérumot is tartalmazó médiumban tartjuk, akkor gömb alakú aggregátumokat, EB-eket képeznek. Ezeket az EB-eket pár nap múlva letapasztva, a legkülönbözőbb sejtípusok változatos arányban jelennek meg a sejtenyészetekben. A differenciáció 12 napján

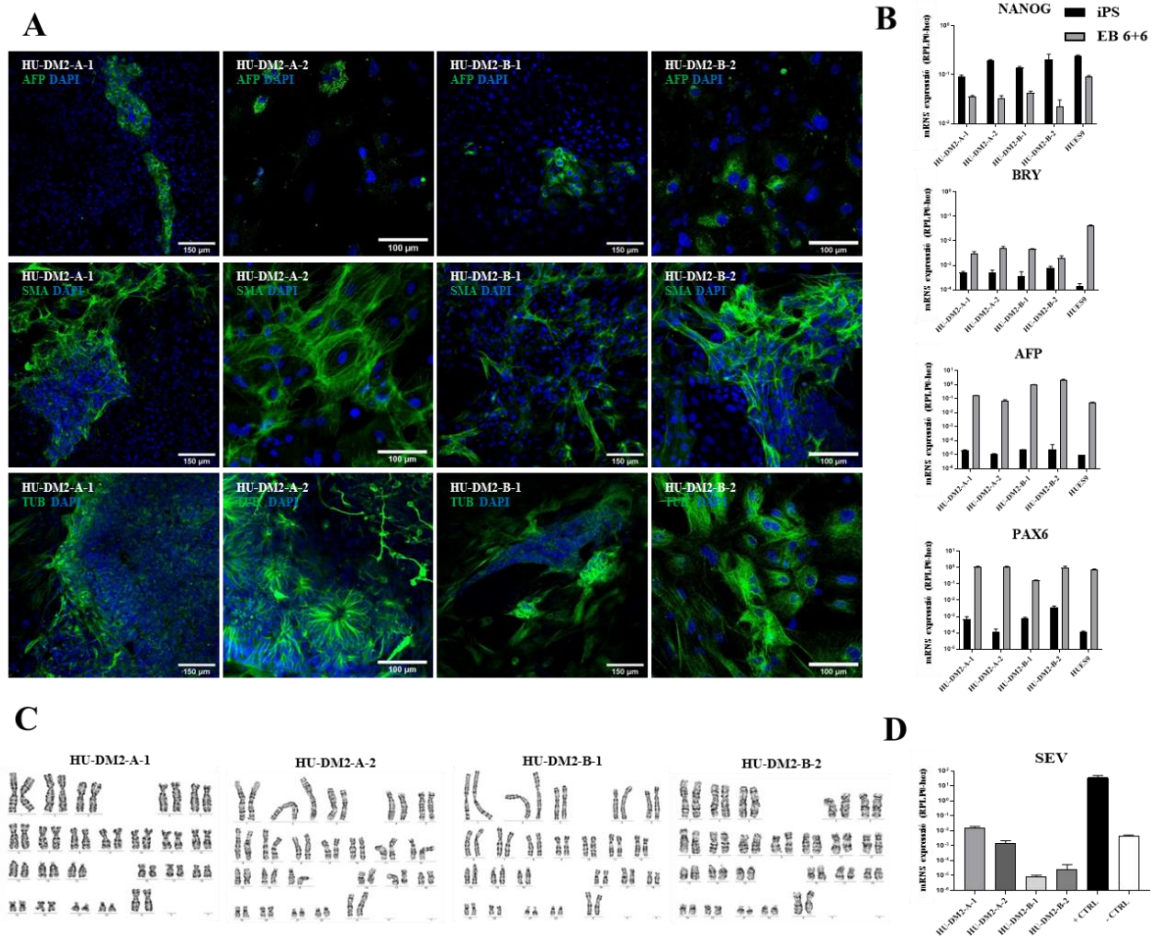
megfestve vagy belőlük mRNS-t kivonva a három csíralemezre jellemző markereket detektálhatunk. Az ektodermát a neuroepithelial stem cell protein (Nestin), B-III-tubulin vagy a Paired box protein 6 (Pax6), a mezodermát a T-box transcription factor T (T-Brachyury) vagy a smooth muscle actin (SMA), míg az endodermát az Alpha Fetoprotein (AFP) vagy a SRY-Box Transcription Factor 17 (SOX17) expressziójának követésével mutatjuk ki.

A következő reprezentatív ábrán (8.A és B) a spontán differenciáció vizsgálatának tipikus eredményeit mutatom be. Az előző ábrán szereplő iPSC sejteket spontán differenciáltattuk, majd a 12 napos minták egy részét fixáltuk az AFP, SMA és B-III-tubulin festéshez, míg a másik részükből mRNS-t izoláltunk, hogy a Nanog, Brachyury, AFP és Pax6 mRNS szinteket megmérjük. Itt a differenciálatlan őssejtekből is tettünk fel mintákat, hogy lássuk a spontán differenciáció hatását az adott gének kifejeződésére. Amint a 8.A ábra is mutatja, minden klónban találtunk a három csíralemezre jellemző sejteket immunfestéssel, és az RT-PCR eredményeink is azt mutatják (8.B ábra), hogy nagyságrendi különbség van a differenciálatlan és a differenciált sejtek mRNS expressziója között. A vártnak megfelelően a Nanog magas expressziót mutat a differenciálatlan sejtekben és erősen csökkent értéket a differenciált származékokban. A differenciációs markerek pedig jóval magasabbak a differenciált sejtekben, míg a differenciálatlan sejtekben az expressziójuk alacsony szinten marad.

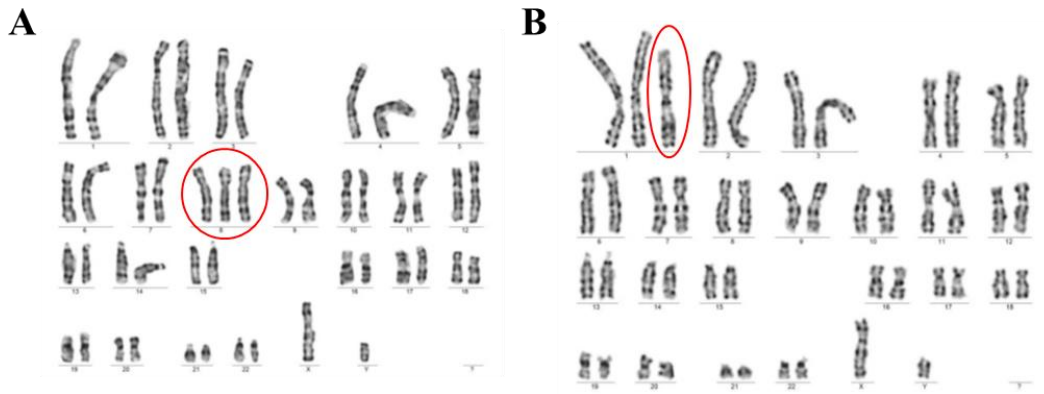
A pluripotencia ellenőrzése után a létrehozott és a kísérletekben használt őssejtvonalak kariotípusát is ellenőrizni kell. Az őssejt tenyészetekből kromoszóma preparátumot készítünk, a metafázisos magok kromoszómáinak vizsgálatával ki lehet szűrni a sejtvonal alapítás vagy az *in vitro* tenyésztés során bekövetkező nagyobb genetikai változásokat/rendellenességeket. A 8.C ábrán normál kariotípusú sejtek láthatók. A jellemezésben a Sendai vírus kiürülésének (8. D ábra) és a mikoplazma mentességnek (erre többféle módszer áll rendelkezésre) a bizonyítása is fontos lépés. Amennyiben mi hozzuk létre a sejtvonalakat, a genetikai egyezést short tandem repeat (STR) vizsgálattal, míg az esetlegesen a betegmintában meglévő eredeti mutációk jelenlétét az iPSC vonalakban Sanger szekvenálással bizonyítjuk (erre itt nem mutatok példát).

Tapasztalataink szerint 12 kezdeti klónból legalább 3-3 pluripotens és normál kariotípusú sejtvonal készíthető (néhány példa a rendellenes kromoszóma elrendeződésre a 9.A és B ábrán látható). Bár a Sendai vírussal végzett visszaprogramozás elég hatékony, az őssejtvonalak stabilan pluripotenssé tétele és a normál kariotípusú klónok létrehozása tudás-, idő- és költségigényes. Nem csoda, hogy egy egész iparág épült arra, hogy a

különböző terápiás és kutatási célú iPSC vonalakat létrehozják, ezzel segítve a kutatók munkáját (Applied Biosystem cég például kínál ilyen lehetőségeket).



8. ábra A pluripotencia további jellemzése (A) Spontán differenciált tenyészetek immunfestése a csíralamez markerekre (AFP, SMA, TUB-zöld), a magokat (kék) DAPI-val festettük. (B) A csíralamez markerek és a Nanog mRNS expressziós szintjeinek változása a spontán differenciáció során, RT-PCR-módszerrel vizsgálva. A génexpressziók a RPLP0 háztartási génre vonatkoztatott átlagának \pm SD értékét ábrázolják. (C) Kariotípus elemzés a kromoszómák G-banding festésével. (D) A Sendai vírus kiürülésének bizonyítása a vírus backbone RT-PCR vizsgálatával. A pozitív kontroll egy Sendai vírussal frissen fertőzött sejtvonal, míg a negatív egy embrionális őssejtvonal (HUES9) értékeit mutatja. A génexpressziók a RPLP0 háztartási gén expressziójára vonatkoztatott átlagának \pm SD értékét mutatják.



9. ábra Reprezentatív példák a normálistól eltérő kromoszóma számra (aneuploidia) (A) Ebben a metafázisban számfeletti 8-as kromoszóma látható. (B) Ebben a metafázisban látható egy számfeletti kromoszóma, ami feltehetően az 1-es kromoszóma hosszú kar izokromoszómája (két 1-es hosszú karból áll).

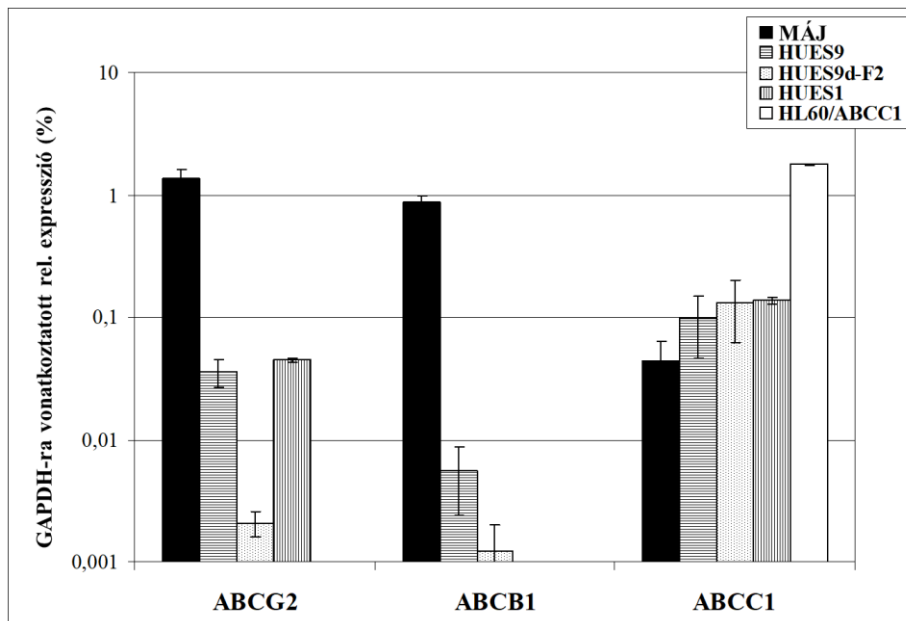
4. 2. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és vizsgálata

A humán embrionális őssejtvonalak stabilizálása után következő években nagyon sok mindent megtudtunk a pluripotens állapotról; meghatározásra kerültek azok a markerek, amelyekkel a pluripotens állapotot jellemezni lehet [131], megismertük a meghatározó transzkripciós faktorokat és ezek egymásra hatását [132], kidolgozásra kerültek a pluripotens állapotú tenyésztés és a különböző sejttípusok irányába történő differenciáció módszerei [133]. Amikor 2006-ban a szükséges engedélyek beszerzése és a humán embrionális sejtek tenyésztésére alkalmas laboratórium kialakítása után végre mi is elkezdhattük a munkát ezekkel a végtelenül érdekes sejtekkel, az első kérdéseink a működésükre vonatkoztak.

4.2.1. Milyen multidrog transzporterek működnek a pluripotens őssejteken?

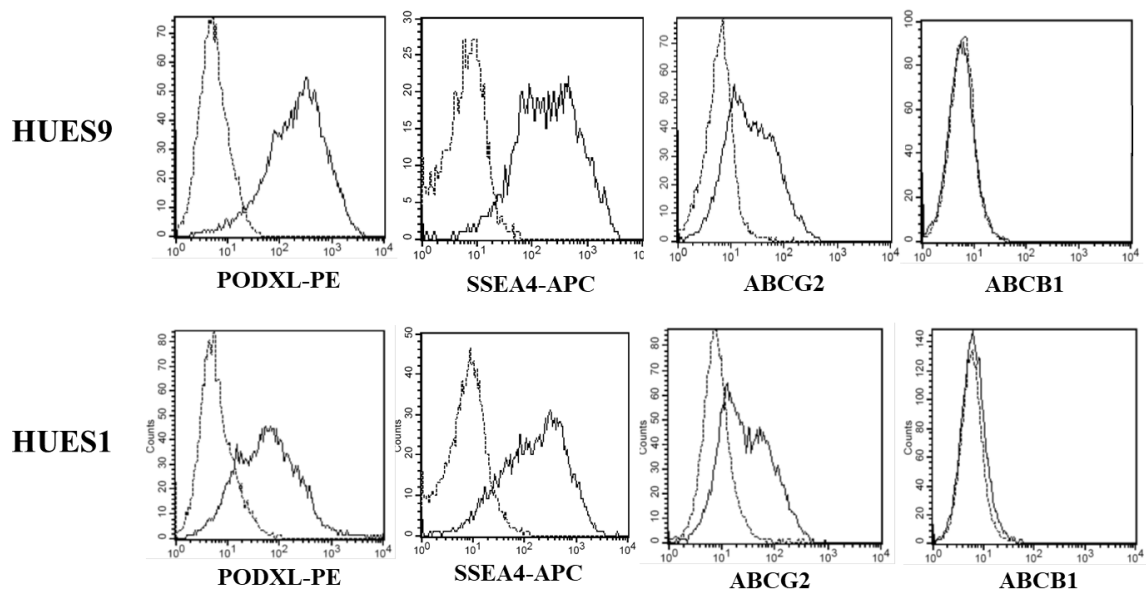
(vonatkozó fontosabb közlemény: Apáti A. et al. Biochim Biophys Acta. 2008.)

A magzat az anyaméhben nagyon sok külső károsító tényezővel szemben védett: például a placenta kiszűri a magzatra toxikus anyagok jó részét, de sajnos nem mindent. Úgy gondoltuk, hogy az őssejteknek saját védelemre is szükségük lehet. Az első kérdés az volt, hogy a multidrog transzporterek közül melyek fejeződnek ki és működnek a humán embrionális őssejteken. Két olyan sejtvonalon kezdtük meg a munkát, amelyeket a Harvard Egyetemen Douglas Melton kutatócsoportjában alapítottak (a HUES1 és HUES9 hESC vonalakon - [134]).



10. ábra Multidrog transzporter mRNS-ek expressziós szintjei különböző sejtvonalakban. A grafikonon a valós idejű PCR-rel meghatározott expressziós szintek átlagértékei (\pm S.E.M.), legalább három független mérés eredménye láthatók; belső kontrollként GAPDH-t használtunk. MÁJ: főtális máj mRNS minta; HUES9d-F2: HUES9-eredetű fibroblaszt sejtvonal; HL60/ABCC1: gyógyszer-rezisztens, ABCC1-et túltermelő sejtvonal.

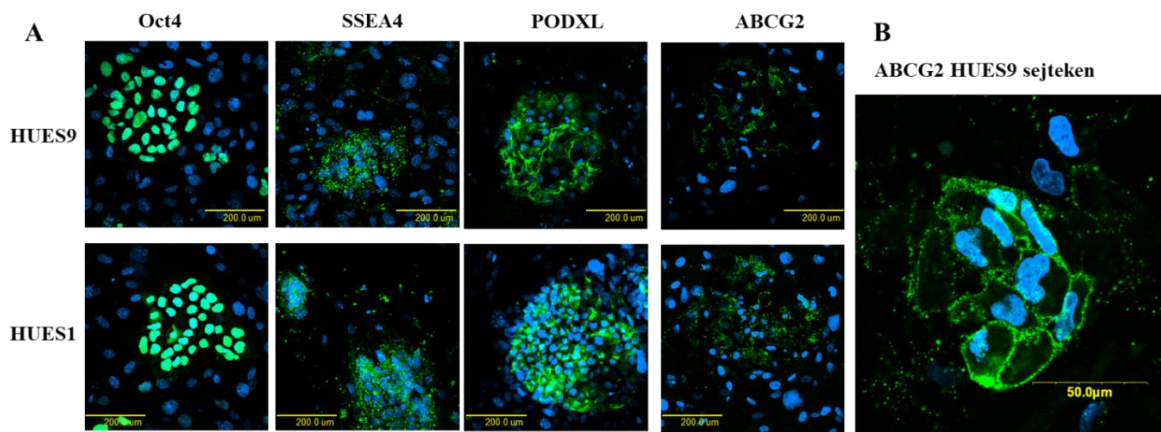
A három alap-transzporter, az ABCB1, ABCC1 és ABCG2 mRNS szintű kifejeződését főtális máj mintához hasonlítottuk. Azt tapasztaltuk (10. ábra), hogy a differenciálatlan őssejt ABCG2 expressziója alacsonyabb, de mindkét vonalon mérhető mértékű volt, míg a HUES9-ből differenciáltatott fibroblaszt-szerű sejteken az ABCG2 mRNS szint drasztikusan csökkent a differenciálatlan sejtekhez képest. Az ABCB1 kifejeződése mind a differenciálatlan, mind a differenciált sejteken elenyésző volt a máj mintához képest. Az ABCC1 esetében pedig azt a meglepő eredményt kaptuk, hogy mind a differenciálatlan, mind a differenciált őssejt eredetű mintákban magasabb volt az mRNS szint, mint a máj mintákban. Hogy a jelenséget jobban, összefüggéseiben lássuk, egy olyan rákos sejtvonal mintát is feltettünk kontrollnak, amiről tudtuk, hogy az ABCC1-et magas szinten kifejezi (ABCC1 túlexpresszázó HL60 sejtvonal). Az őssejt eredetű mintákban mért expresszió a túlexpresszázó sejtvonallal is összemérhető volt. A következő lépés a fehérje kifejeződés vizsgálata volt, amit az ABC transzporterek elleni specifikus ellenanyagokkal (5D3-ABCG2, MRK16- ABCB1 és R1- ABCC1) áramlási citometria segítségével végeztünk, és először csak a pluripotens állapotú sejteket vizsgáltuk (11. ábra).



11. ábra A differenciálatlan HUES9 és HUES1 sejtfelszíni marker expressziójának áramlási citometriás mérései. Az őssejtekből egysejtes szuszpenziót tripszinezéssel nyertünk. A nem életképes sejteket Topro3 vagy 7AAD festéssel zártuk ki. A fennmaradó egér dajkasejteket Sca-1-FITC jelöléssel kizártuk. SSEA4-APC és PODXL-PE festést a differenciálatlan állapot markereként használtuk. A G2 és B1 ABC transzportereket indirekt módszerrel jelöltük. A szaggatott vonalak a megfelelő izotípusnak megfelelő kontroll ellenanyagokkal történő festést mutatják.

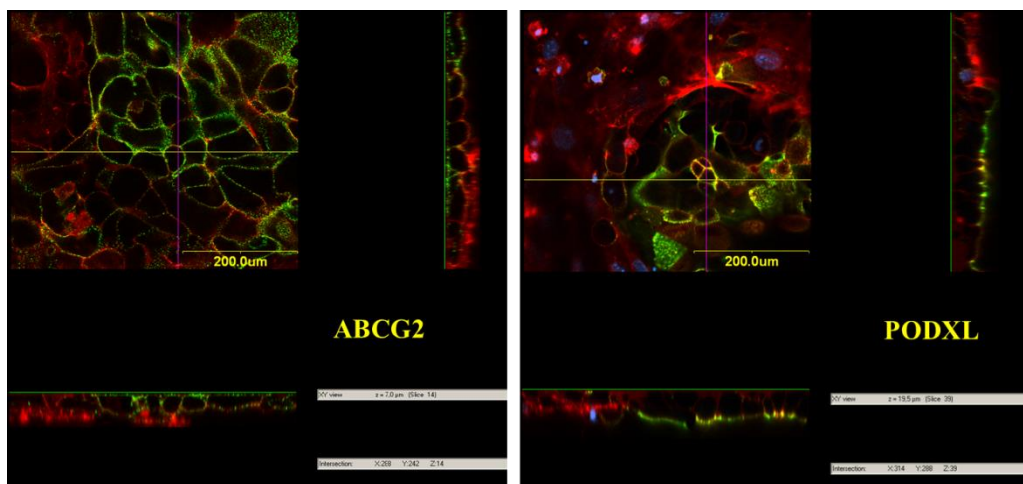
Méréseink azt mutatták, hogy az őssejtek kifejezik az hESC-kre jellemző felszíni markereket (SSEA4 és PODXL), míg az ABCG2 kifejeződése heterogenitást mutatott, a sejtek 40-60%-a bizonyult pozitívnak. Sem az ABCB1, sem az ABCC1 fehérje jelenlétét nem sikerült kimutatni ezzel a módszerrel, ami az ABCB1 esetében nem volt meglepő, mert az mRNS szint is igen alacsony volt. Az ABCC1 esetében azonban a magas mRNS expresszió ellenére nem láttunk annak megfelelő fehérjét, amit okozhat az, hogy néhány sejtben nagyon magas az ABCC1 expresszió, ami eltolja az átlag mRNS expresszióját, vagy ami valószínűbb, hogy az ABCC1 mRNS poszttranszkripció vagy negatív transzlációs szabályozás alatt áll a hES sejtekben.

Eredményeink azt sugallták, hogy a pluripotens őssejteken az ABCG2 fejeződik ki a fő MDR transzporterek közül, ezért konfokális mikroszkóppal is megvizsgáltuk a sejteinket (12. ábra). A felvételeken jól kivehetők az egér dajkasejteken elhelyezkedő őssejtcsomók, amelyek pozitívak az őssejtmarkerekre (Oct4, SSEA4 és PODXL) és festődnek ABCG2-vel is. A nagyobb nagyítású képen jól látszik az ABCG2 plazmamembrán elhelyezkedése is.



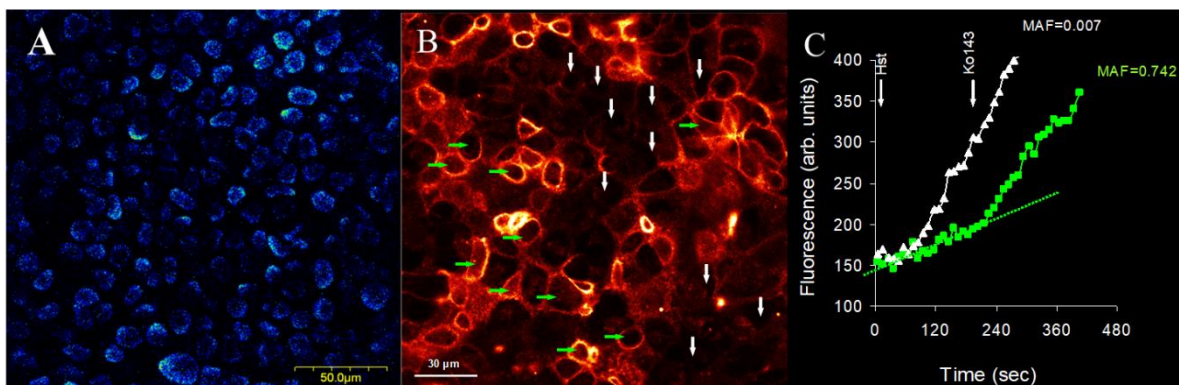
12. ábra A pluripotencia markerek kimutatása differenciálatlan HuES sejtekben. (A) A HUES9 és HUES1 sejteket a festés előtt két napig egér dajkasejteken, konfokális kamrán tenyésztettük. A markerek csak a pluripotens hESC csomókat festették meg, míg az egér dajkasejtek nem mutattak festődést az Oct4, SSEA4, PODXL és ABCG2 (zöld) ellenanyagokkal jelölve. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. (B) A HUES9 sejtek plazmamembrán lokalizációja nagyobb nagyítással jól kirajzolódik (ABCG2 –zöld, sejtmagok DAPI-val - kék).

Az összejt csomók háromdimenziós (z-stack) vizsgálata is azt mutatta, hogy az ABCG2 a plazmamembránban helyezkedik el (zömében középen), míg a szintén membránban elhelyezkedő PODXL inkább a csomók tetején volt látható (13. ábra).



13. ábra Az ABCG2 és PODXL kifejeződése differenciálatlan HUES9 sejtek sejtfelszínén. A HUES9 sejteket egér dajkasejteken tenyésztettük nyolchjúkú kamrában, két napig a konfokális mikroszkópos vizsgálat előtt. A tenyészeteket óvatosan fixáltuk, és megfestettük ABCG2 (A) és PODXL (B) (zöld) ellenanyaggal. A differenciálatlan markerek csak a HUES9 sejt csomókat festették meg, míg az egér sejtek ezekkel a markerekkel nem mutattak festődést. A plazmamembránt és a Golgi-t WGA-val (piros) festettük. A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük a PODXL esetében. A Z-stack analízist az ibolya (jobb oldali panel) és a sárga (alsó panel) jelölt vonal mentén végeztük.

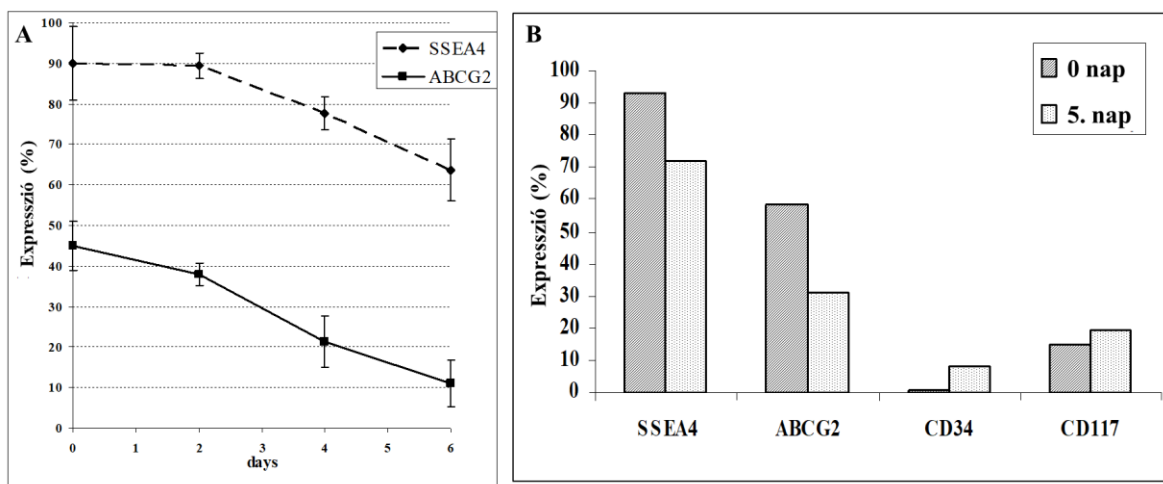
Miután láttuk, hogy az ABCG2 kifejeződik a hESC sejteken és a plazmamembránban helyezkedik el, kíváncsiak voltunk, hogy vajon funkcióképes-e. Az ABCG2 funkcióját úgy lehet vizsgálni, hogy jelzett szubsztrátot adunk a sejtekhez, amit a működőképes ABCG2 kipumpál a sejtekből. Az ABCG2 szelektív gátlószerét adva a rendszerhez a kipumpálás lassul vagy teljesen meg is szűnik. Amennyiben ez a szubsztrát önmagában fluoreszcens, mint a Hoechst 33342 (Hst) magfesték, akkor a sejten belüli (jelen esetben a sejtmag) fluoreszcencia szint változása felvilágosítást nyújt a transzporter működéséről. Az ABCG2 specifikus gátlószer a Ko143, amit a sejtekhez adva a transzporter működését gátolja, így a fluoreszcens szubsztrát bejut a sejtekbe. A kísérletet elvégezve, a fluoreszcencia intenzitást időben ábrázolni tudjuk és kiszámolható a multidrog rezisztencia aktivitás faktor (MAF) is. Mivel tudtuk, hogy az őssejteknek csak kb. a fele fejezi ki az ABCG2-t, a transzport mérést követően az ABCG2-t *in situ* jelöltük és külön értékeltük az 5D3 ellenanyaggal festődő ABCG2 pozitív és negatív sejteket. Ahogy az a 14. ábrán is látszik, az ABCG2-t kifejező sejtekben a Hst fluoreszcencia intenzitása lassabban nő, mint a negatív sejtekben, azonban a szelektív gátlószer (Ko143) adása után az ABCG2-t kifejező sejtekben is megnő a festék felvétel sebessége, megközelítve a negatív sejtekben mérhető értéket.



14. ábra. Az ABCG2 transzporter funkcionális elemzése differenciálatlan hES sejtekben. HUES9 sejteket egér dajkasejteken, konfokális kamrában tenyésztettük a mérés előtt egy napig. A Hst festék sejtmagban történő felhalmozódását élő HUES9 sejtekben konfokális mikroszkóppal követtük. majd kb. 2 perccel a Hst hozzáadása után, 1 μM Ko143 hozzáadásával gátoltuk az ABCG2 működését; (A) Hst felvétel végén kékre festődött sejtmagok láthatók. (B) A Hst felvétel mérése után ugyanazt az őssejtsomót festettük 5D3 antitesttel ABCG2-re. A zöld nyilak a magas ABCG2 expresszióval rendelkező sejteket jelzik, míg a fehér nyilak azokat a sejteket mutatják, amelyekben nincs ABCG2 expresszió. (C) A Hst festék magi felhalmozódásának kinetikája; A zöld görbét az ABCG2-t expresszáló sejtek adataiból számítottuk ki (zöld nyilak). A fehér görbét olyan sejtek adataiból számítottuk ki, amelyek nem fejezik ki az ABCG2-t (fehér nyíl). Az ABCG2 aktivitási tényezőt (MAF) mindkét esetben az Módszerek részben leírtak szerint számítottuk ki.

Ezekkel a kísérlettel nemcsak azt bizonyítottuk, hogy a HUES9 sejtekben kifejeződik az ABCG2 és a plazmamembránban helyezkedik el, de azt is, hogy funkcióképes, azaz képes a szubsztrátjait kipumpálni a sejtekből. Az ABCB1 és ABCC1 esetében is végeztünk funkcionális kísérleteket, ezek a transzporterek ugyanis a Calcein-AM vegyületet tudják kipumpálni a sejtekből. A Calcein-AM mellé adva az ABCB1 (10 μ M Verapamil) vagy az ABCC1 (MK571) szelektív gátlószerét, a sejtekben a fluoreszcencia szint emelkedés gyorsulása várható (mint az ABCG2 esetében, ha a Ko143-at adjuk a sejtekhez). A HUES9 sejtek gyorsan töltődtek Calcein-nel, továbbá sem az ABCB1 sem az ABCC1 gátlószere nem változtatott a fluoreszcencia intenzitáson. Ebből arra következtettünk, hogy az expressziós adatainkkal összhangban ez a két fehérje nem expresszálódik számottevően az őssejteken.

Mivel úgy tűnt, hogy az ABCG2 a differenciálatlan őssejtekre jellemző, megvizsgáltuk, hogy a különböző őssejtől differenciáltatott sejteken vajon kifejeződik-e. Ha a sejteket hagytuk túlnőni a tenyészetben, spontán differenciálódni kezdtek és folyamatosan vesztették az SSEA4 pluripotencia markerüket, az ABCG2-vel párhuzamosan (15.A ábra). Hasonló jelenséget tapasztaltunk, ha hemopoetikus irányba differenciáltattuk a sejteket, a hemopoetikus markerek megjelenésével párhuzamosan csökkent az SSEA4 és az ABCG2 expressziója (15.B ábra). Ha fibroblaszt-szerű vagy dobogó szívizomsejteket hoztunk létre, ezeken szintén nem tapasztaltunk ABCG2 expressziót.

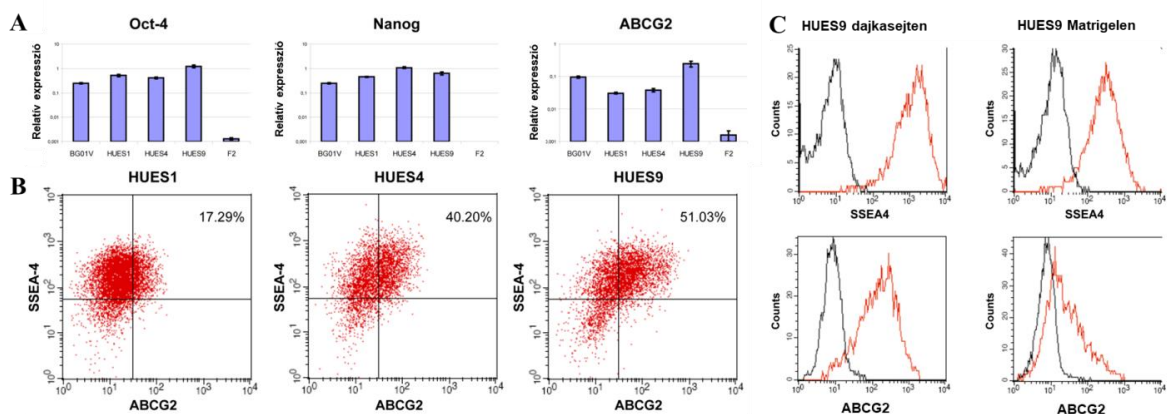


15. ábra A HUES9 sejt felszíni marker expressziójának áramlási citometriai elemzése a differenciálódás korai szakaszában. (A) Az SSEA4⁺ és ABCG2⁺ sejtek százalékos aránya spontán differenciáció kezdeti szakaszában. A 0. nap differenciálatlan HUES9 sejteket jelöl. Három független kísérlet eredményeinek átlagát (\pm SE) mutatjuk be. (B) Az SSEA4⁺, ABCG2⁺, CD34⁺ és CD117⁺ sejtek százalékos aránya HUES9/OP9 ko-kultúrában a 0. és 5. napon áramlási citometriával meghatározva. A CD34⁺ és CD117⁺ sejtek százalékos aránya az 5. napon az SSEA4 negatív populációban számolva.

Ebben a közleményben azt is bemutattuk, hogy a HUES9 sejteket az ABCG2 védi a mitoxantron által kiváltott sejthaláltól, miközben mind az ABCG2 pozitív sejtek aránya, mind az expressziós szint (median) enyhén megemelkedik a tenyészetekben. Mivel az ABCG2 szerepét a stressz elleni védelemben tovább vizsgáltuk, az erre vonatkozó adatokat abban az alfejezetben (4.2.2) mutatom be.

(vonatkozó fontosabb közlemény: Sarkadi et al. Stem Cells. 2010)

Pár hónappal a cikkünk megjelenése után egy másik kutatócsoport azt találta, hogy „ az ABCG2 hiánya a humán pluripotens őssejtek új jellemzője, amely megkülönbözteti őket sok más őssejtektől, beleértve az egér ESC-eket, és oka lehet annak, hogy érzékenyek a szuboptimális tenyésztési körülményekre.” [135]. Mivel többek között az általunk is vizsgált HUES1 sejtvonalon sem találtak expressziót (a cikkünkre nem hivatkoztak), úgy döntöttünk, hogy megfogalmazzuk kritikai észrevételeinket [136]. Ebben a rövid közleményben rámutattunk az ABC transzporterek kutatásának buktatóira (1, megfelelő érzékeny vizsgálati módszert kell alkalmazni a funkcionális vizsgálatokhoz 2, a heterogén populáción belül az ABC transzportert kifejező alpopuláció kicsi lehet 3, az ABC transzporterek kifejeződése nagyban függ az adott sejt környezetétől), illetve az említett közlemény metodikai hiányosságaira. Megmutattuk további rendelkezésünkre álló embrionális őssejtvonalakon is az ABCG2 expressziót és rámutattunk, hogy a nem egér dajkasejten, hanem csak extracelluláris mátrixon (Matrigel) tenyésztett sejtek esetében az ABCG2-t expresszáló sejtek száma és az expresszió mértéke is csökkenhet (16. ábra).



16. ábra. Őssejtmarkerek és az ABCG2 expressziója különböző humán embrionális őssejtvonalban. (A) Az őssejtmarkerek (Oct4, Nanog) és ABCG2 relatív expressziója négy differenciálatlan humán ES sejtvonalban (BG01V, HUES1, HUES4, HUES9). A vizsgált génekhez valós idejű TaqMan® tesztekkel használtunk, a riboszomális RPLP0 háztartási génhez viszonyított expressziós szinteket \pm S.E.M. dCt módszer szerint határoztuk meg. (B) Az SSEA4 differenciálatlan őssejtmarker és az ABCG2 fehérje sejtfelszíni expressziójának áramlási citometriai vizsgálata különböző humán differenciálatlan ES sejtekben. Az együttes expressziós szinteket a százalékos

arányok mutatják. Az ABCG2 jelöléshez az elsődleges 5D3 monoklonális antitestet használtunk, Ko143 specifikus gátlószer alkalmazása mellett. Az elhalt sejteket a 7AAD jelek alapján zártuk ki, a kvadráns határait a megfelelő izotípus kontrollokhoz állítottuk be. (C) Az SSEA4 és az ABCG2 áramlási citometriás analízise differenciálatlan HUES9 sejteken, azonos passzázsszámokkal (p25), egér dajkasejten vagy Matrigelen tenyésztve. A Matrigelen való tenyésztés jelentősen csökkenti az ABCG2 fehérje expresszióját. Az antitestek és a kimutatási paraméterek ugyanazok voltak, mint a B panelen.

Egy 2016-ban megjelent összefoglaló cikkben áttekintettük azokat a kulcsfontosságú ABC és SLC gyógyszer transzportereket, amelyek hozzájárulnak a differenciálatlan emberi őssejtek működéséhez és/vagy védelméhez, valamint szerepük van a szöveti differenciálódás során [80]. Különös figyelmet fordítottunk arra, hogy bemutassuk a különböző technikákat, amelyek a transzporterek expressziójának és működésének tanulmányozására alkalmasak endogén expressziós rendszerekben, és ennek részeként egy táblázatban foglaltuk össze az őssejtekben az ABCG2-ről addig megjelent közleményeket (lásd még [80] cikk 1 táblázat).

Az találtuk, hogy mRNS szinten a legtöbb csoport kimutatta az ABCG2-t humán pluripotens őssejtekben, míg fehérjeszinten csak több-kevesebb sikerrel tudtak ABCG2-öt kimutatni. Az eltérő eredményeket elsősorban a sejtvonalak eltérő tulajdonságai, a különböző tenyésztési körülmények és a jelölési technikák változatossága okozhatja. Mivel kutatócsoportunk évtizedek óta vizsgálta ezeket a transzportereket, meggyőződésünk volt, hogy az alkalmazott technikáink megfelelőek és az eredményeink megbízhatóak, ezért tovább folytattuk az ABCG2 kutatását az őssejtekben. A következő fejezetben arra kerestük választ, hogy valójában nyújtanak-e védelmet az őssejteknek?

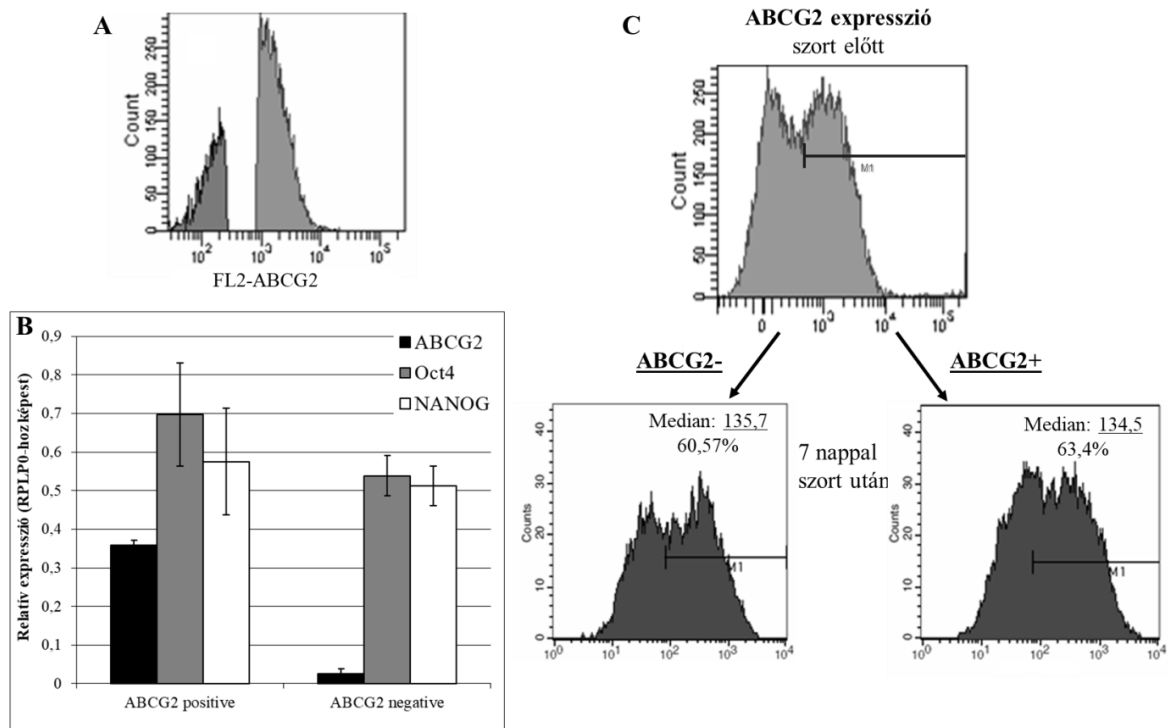
4.2.2. Mire használja az őssejt a transzportereket?

(vonatkozó fontosabb közlemény: Erdei et al. Eur Biophys J. 2013)

Az ABCG2 kifejeződése nem nélkülözhetetlen az élethez (a Junior negatív vércsoportba az ABCG2 hiányos embereket soroljuk), azonban kiderült, hogy a knock-out egerek érzékenyebbek a xenobiotikumokra, és csökkent a hemopoiitikus őssejtjeik mennyisége is. Mint láttuk, az ABCG2 jelen van a humán pluripotens őssejtvonalakban és heterogén expressziós mintázatot mutat. A következő lépésekben ennek a heterogenitásnak a szerepét és funkcióját vizsgáltuk.

Ha a hPSC tenyészeteket sejtszorterrel szétválogattuk ABCG2 pozitív (ABCG2⁺) és negatív (ABCG2⁻) populációkra (17.A ábra), és megmértük az Oct4 és a Nanog pluripotencia markerek kifejeződését, nem találtunk szignifikáns eltérést a két populáció

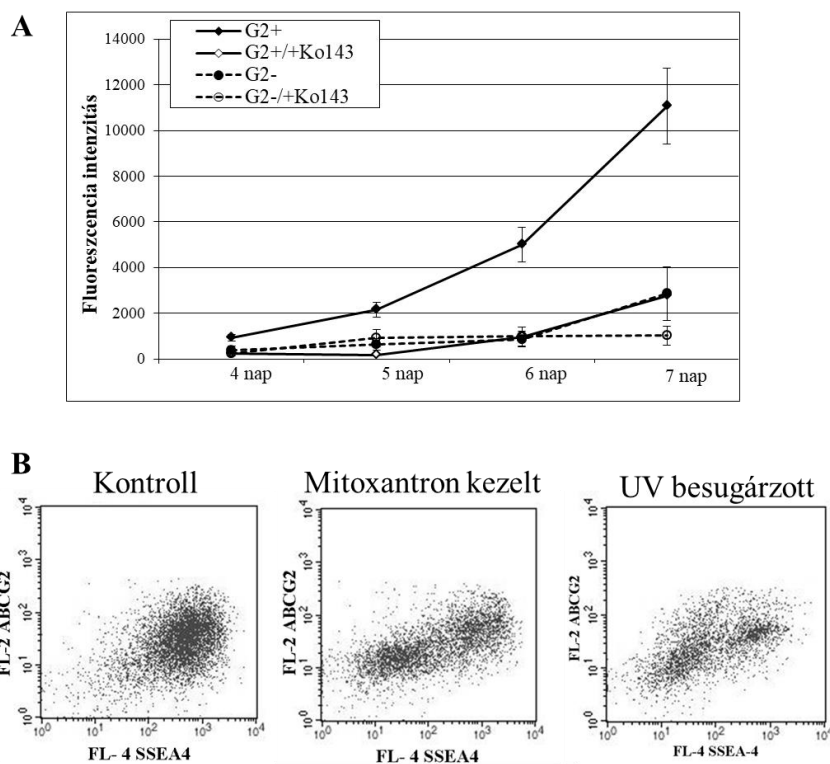
között. Ami azt jelenti, hogy nincs különbség a differenciációs állapotban, mindkét populáció pluripotens (az SSEA4 expresszió is ezt erősíti meg, mivel minden ABCG2 sejt egyben SSEA4 pozitív is, lásd 17.B ábra).



17. ábra Az ABCG2 heterogén expressziója HUES9 sejteken (A) A reprezentatív hisztogram azokat a sejtpopulációkat mutatja, amelyet ABCG2- illetve ABCG2+ sejtek szétválasztásakor használtunk. (B) ABCG2 pozitív és negatív sejtpopulációk kvantitatív RT-PCR elemzése sejtválogatás után. Az Oct4 és NANOG pluripotencia markereket az ABCG2 pozitív és negatív sejtpopulációkban vizsgáltuk, és az RPLP0 háztartásigén mRNA szintjéhez viszonyítva ábrázoltuk. A pluripotencia markerek nem mutattak szignifikáns különbséget az ABCG2 pozitív és negatív sejtpopulációk között. (C) A HUES 9 sejteket egér dajkasejteken tenyésztettük, és 5D3 festés alapján válogattuk le sejtiszorrel. Az szétválasztott populációkat tovább tenyésztettük egér dajkasejteken. Hét nappal a válogatás után az ABCG2-t expresszáló sejtek aránya visszatért a kiindulási tenyészetekre jellemző szintre.

Ha a szétválogatott ABCG2 pozitív és negatív sejteket tovább tenyésztettük, 7 nap múlva a kiindulási sejtpopulációnak megfelelő arányt kaptuk vissza (17.C ábra). Ami azt mutatja, hogy a tenyészetben az ABCG2-t expresszáló sejtek aránya nem változik, azaz a sejtvonaltól és a tenyésztési körülményektől függően kialakul egy dinamikus egyensúly. Ha az ABCG2-nek a stressz elleni védekezésben van szerepe, akkor ez populációs szinten egy nagyon hatékony megoldás. Mivel a transzporterek működése energiát fogyaszt és a stressz faktorok nincsenek folyamatosan jelen, nem kell a teljes populációt védeni, viszont

a stressz körülmények között mindig lesz túlélő populáció. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani a következő kísérletsorozat (18. ábra). A hPSC tenyészetet ABCG2 pozitív és negatív sejtekre sejtiszorítással szétválogatva azt tapasztaltuk, hogy a pozitív sejtek gyorsabban kezdtek el szaporodni, mint a negatív sejteket tartalmazó populációk. Ha a tenyészeteket a sejtiszorítás után az ABCG2 szelektív gátlószerét (Ko143) is tartalmazó médiumban tenyésztettük, akkor a sejtek száma nem nőtt egyik populáció esetében sem (18.A ábra). Ez azt mutatja, hogy az ABCG2-nek szerepe van a sejtiszorítás során fellépő stressz hatásokkal szemben (mechanikai és lézer besugárzás). Hogy ezt a kérdést jobban körüljárjuk, megvizsgáltuk, hogy ez a rákos sejtekhez és túltermeltetési sejtvonalakhoz viszonyítva alacsony endogén ABCG2 megvédi-e az őssejteket olyan stresszek ellen, mint a drogkezelés vagy az UV besugárzás (18.B ábra).



18. ábra (A) A szétválogatott sejtpopulációkat ABCG2 inhibitor (Ko143, 5 μ M) jelenlétében vagy hiányában növesztettük Matrigellel bevont lemezeken és követtük a sejtnövekedés mértékét. Az ABCG2 pozitív sejtpopuláció fokozott proliferációs képességet mutatott, amely az ABCG2 funkció gátlásával (Ko143 kezelés) megszüntethető volt. (B) A HUES9 sejteket egér dajkasejteken tenyésztettük, az SSEA4 és ABCG2 expressziót egyidejűleg elemeztük a kezelés után 72 órával áramlási citometriával. A panelek reprezentatív hisztogramokat mutatnak, amelyeket legalább három független kísérletről választottunk ki, 10 nM Mitoxantron illetve 5 perces UV besugárzást követően.

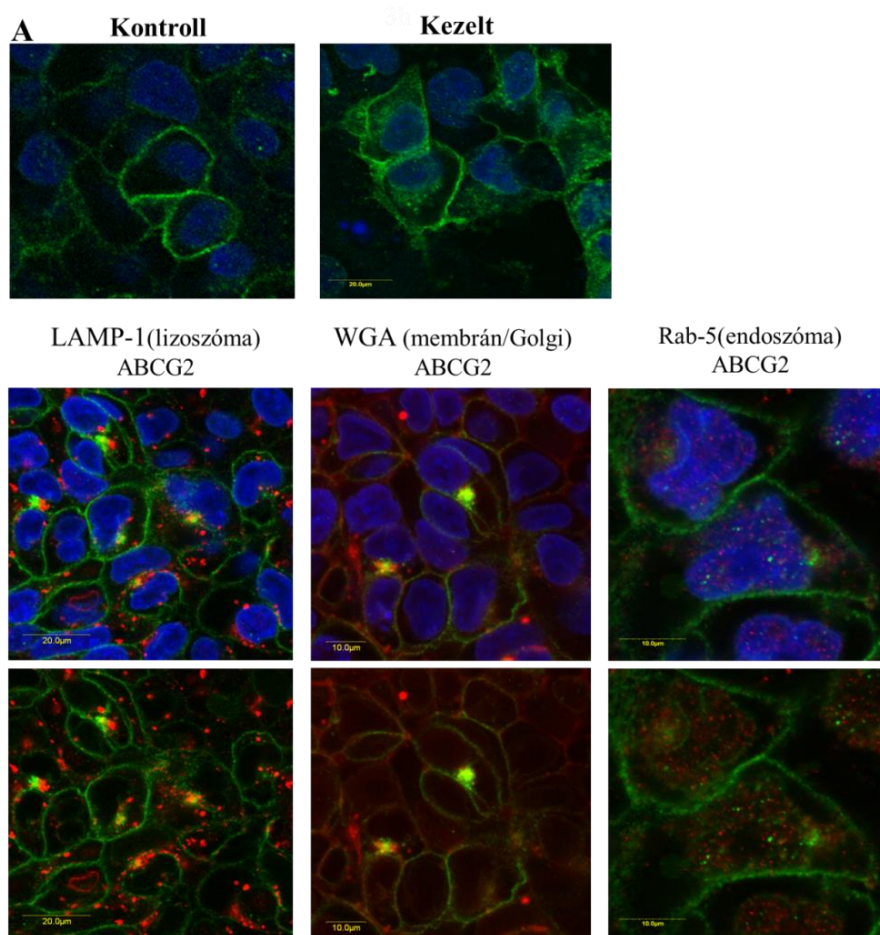
A kontroll sejtekhez képest a mitoxantron kezelés (10 nM) két különböző populációt eredményezett; egy, az ABCG2 és SSEA4 együttes sejtfelszíni expresszióját mutatót (pluripotens állapot), és egy csökkent SSEA4 és ABCG2 pozitivitásút (részlegesen differenciált állapot). A mitoxantron kezeléshez hasonlóan az UV besugárzás hatására a kezelt sejtek egy részében csökkent SSEA4 festődés volt megfigyelhető, ami a pluripotencia elvesztésére utal. Mind az MX-kezelésben, mind az UV-fény expozícióban a specifikus ABCG2 inhibitor Ko143 hozzáadása a sejtek teljes kipusztulását eredményezte. Az SSEA4/ABCG2 kettős pozitív sejtpopulációk, amelyek nagy valószínűséggel azokat pluripotens sejteket tartalmazzák, amelyek olyan szinten fejezik ki az ABCG2-t, amely elegendő az MX vagy az UV besugárzás elleni védelemhez. A kettős negatív populáció nagy valószínűséggel az ABCG2 negatív őssejtek utódait képviseli. Ezek a sejtek differenciálódni kezdtek (amit az SSEA4 marker elvesztése is mutat), ami az őssejtek általános válasza különböző stresszhelyzetekre. A differenciálódott sejtek más mechanizmusokat használva kerülnek ki a toxikus hatásokat (például más ABC transzporterek kifejezésével, amint azt később vizsgáltuk is, lásd 4.2.3.).

Az nem meglepő, hogy az ABCG2 szubsztrátjainak számító vegyületeket a transzporter el tudja távolítani a sejtekből, így a transzportert kifejező sejtek előnnyel rendelkeznek a nem expresszáló társaikkal szemben. Nehezebb azonban megérteni, hogy bizonyos mechanikai igénybevétel vagy UV-sugárzás hatásai ellen miért véd a transzporter. Az egyik magyarázat az lehet, hogy az ilyen sérülések káros anyagok felhalmozódását eredményezik, és az ABCG2-re van szükség ahhoz, hogy eltávolítsa ezeket a toxikus anyagokat a sejtekből. Arra vonatkozóan már van adat, hogy az ABCG2 mérgező hem-származékokat képes transzportálni, amelyek ionizáló sugárzás vagy UV-fény hatására keletkezhetnek a sejtekben [137, 138]. Ezen túlmenően az ABCG2-nek lehetnek ma még ismeretlen endogén szubsztrátjai, illetve más, feltáratlan funkciókkal is rendelkezhet, amelyek felelősek lehetnek ezekért a védőhatásokért (mint például az autofágia [139]).

A mérgező vegyületek elpusztítják a védekezésre nem képes sejteket, de léteznek olyan környezeti tényezők, amelyek nem feltétlenül vezetnek a sejtek halálához. Vajon ilyen esetekben mi történik a transzporterrel? Az enyhe oxidatív állapotok modellezésére az őssejteket szubletális dózisú (150 μ M) H₂O₂-val kezeltük 24 órán keresztül, és az ABCG2 expresszióját a tenyészetekből egymást követő időpontokban vett minták segítségével vizsgáltuk. Bár mRNS-szinten nem észleltünk szignifikáns változást az idő függvényében, a FACS-analízis a H₂O₂ kezelés után rövid idővel (3 és 6 óra) az ABCG2 szint sejtfelszíni csökkenését mutatta. Ez a kifejeződés 24 órával a kezelést követően visszatért a kiindulási

szintre, ami nagy valószínűséggel a H₂O₂ okozta hatások reverzibilitását jelzi (4. ábra az alábbi cikkben [140]).

Az ABCG2 expresszió változásának alaposabb vizsgálata érdekében konfokális mikroszkóppal is követtük a H₂O₂ kezelés hatását. Eredményeink azt mutatták, hogy az ABCG2 részben beszedődik a plazmamembránból az intracelluláris membrán kompartmentekbe (19. ábra). Mivel a membránfehérjéről ismert, hogy különböző sejtalkotókba képesek áttevődni a plazmamembránból, ezért jól ismert markereket használtunk az ABCG2 lokalizációjának ellenőrzésére; a Golgi apparátusban (WGA), a korai endoszómákban (Rab5) és a lizoszómákban (Lamp1) kerestük az ABCG2-t. A Golgiban és az endoszómákban nem tudtuk kimutatni a fehérjét, azonban a Lamp1 fehérje részleges együttfestődést mutatott az ABCG2 fehérjével. Ez arra utal, hogy az ABCG2 fehérjék egy része az oxidatív stresszt követően a lizoszómákban lebomlik, míg a transzporter többi része a plazmamembránból egy sejt belüli kompartmentbe kerül, amelyet nem tudtunk azonosítani.



19. ábra (A) Az ABCG2 immuncitokémiai kimutatása enyhe oxidatív stressz után HUES 9 sejtekben. HUES9 sejteket Matrigel bevonatú kamrákon tenyésztettünk, majd 150 μM H₂O₂-vel kezeltük 3 órán át, fixáltuk, permeabilizáltuk, és 5D3 antitesttel festettük, hogy láthatóvá tegyük az ABCG2-t (zöld). (B) Ko-lokalizációs kísérleteket végeztünk ABCG2 sejt belüli elhelyezkedésének

meghatározására a H₂O₂ által közvetített oxidatív stresszt követően. A különböző intracelluláris kompartmentek (piros) markereit alkalmaztuk, hogy az ABCG2-t (zöld) is tartalmazó intracelluláris kompartmentek azonosítsuk; a LAMP-1 (lizoszómák) és Rab-5 (korai endoszómák), valamint WGA (a Golgi hálózat) jelölésére. A sejtmagokat Hoechst33342-vel (kék) festettük. A megfestett mintákat Olympus FV500-IX konfokális lézerpáztázó mikroszkóppal vizsgáltuk. Minden mérést négy független kísérletként végeztünk, három párhuzamos mérésben.

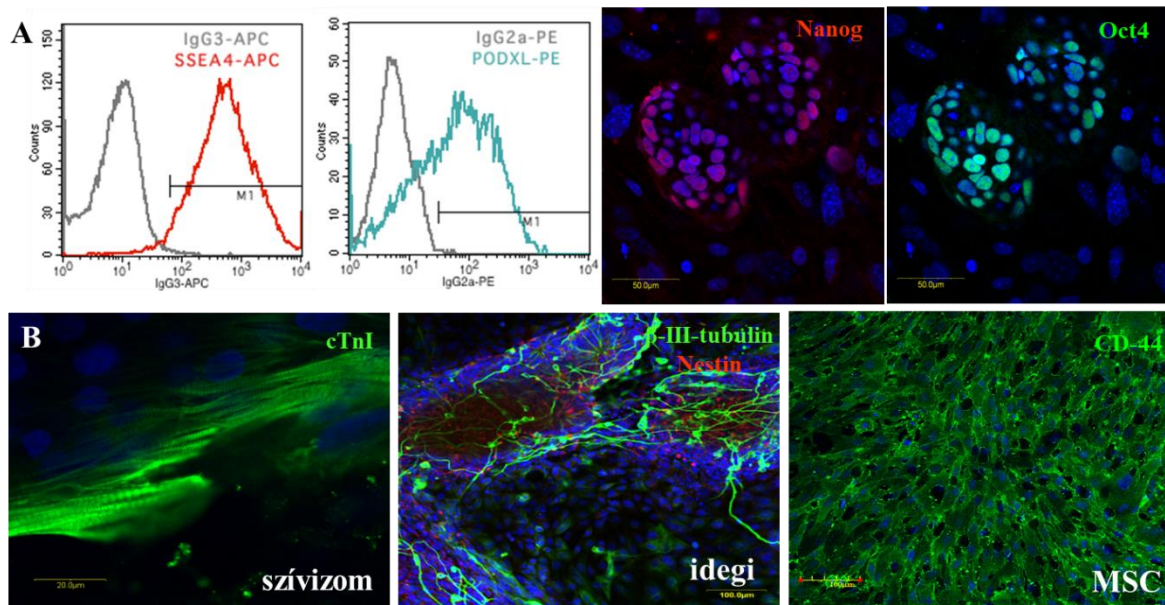
Összefoglalva elmondhatjuk, hogy nem találtunk különbséget a pluripotencia markerek expressziója között ABCG2 pozitív és negatív hESC-kben. Megállapítottuk, hogy ABCG2-t expresszáló sejtek növekedési üteme magasabb volt, miután a hESC sejteket szétválogattuk pozitív és negatív populációkra és ez a hatás az ABCG2 működésétől függött. A hESC tenyészeteket dinamikus egyensúly jellemzi, ami visszaállítja az ABCG2 pozitív/negatív sejtek arányát, ha az egyensúlyt például sejtszortolással vagy enyhe oxidatív stresszel megbontjuk. Kimutattuk, hogy bizonyos káros körülményeket (fizikai stressz, gyógyszerek és UV-sugárzás) a hESC sejtek sokkal jobban tolerálnak az ABCG2 fehérje jelenlétében. Ez a tulajdonság a transzporter funkciójával magyarázható, amely eltávolítja a stressz körülmények között felhalmozódott potenciális toxikus metabolitokat. Ezzel szemben az enyhe oxidatív stressz az ABCG2 gyors internalizációját okozta, jelezve, hogy bizonyos környezeti tényezők a transzporter plazmamembránból való „beszedését” indítják meg (lásd még [141]). Eredményeink arra utalnak, hogy az ABCG2 expresszió dinamikus egyensúlya populációs szinten előnyt jelent, mert a sejtek gyorsan és hatékonyan reagálhatnak a környezet változásaira. Egy ilyen aktívan fenntartott heterogenitás evolúciós szempontból is kedvező lehet a speciális sejtípusok, köztük a pluripotens őssejtek védelmében.

4.2.3. Milyen az ABC transzporterek mintázata a pluripotens őssejteken illetve a belőlük differenciáltatott sejtípusokon?

(vonatkozó fontosabb közlemény: Erdei et al. Cytometry B Clin Cytom. 2014)

Az ABC transzporterek fontos szerepet játszanak különböző élettani funkciókban, fenntartják a homeosztázist, és védekezést biztosítanak a toxikus endo- és xenobiotikumokkal szemben. Az ABC transzporterek egy általános védelmi hálózat részei (kemo-immunitás), átfedő funkciókkal és szubsztrát-specifikussággal, ami azt jelenti, hogy funkcionálisan helyettesíthetik is egymást. A multidrog ABC transzporterek széleskörű szöveti eloszlásúak és az adott szövetre specifikus „ujjlenyomatot” mutatnak, amely megfelel az adott szövettípus speciális metabolikus igényeinek, valamint biztosítja a stressz és a drogok elleni védelmet.

Ebben a tanulmányban megvizsgáltuk, hogy érvényesül-e ez a speciális eloszlás a pluripotens humán embrionális őssejtekben és azok differenciálódott utódsejtjeiben. A hESC-eket tenyésztettük, és egy spontán differenciálódási modellben a kezdeti szöveti elköteleződésnek megfelelő, illetve már jól elkülöníthető differenciált sejttypusokat hoztunk létre; 6 napos differenciált embrió testeket (EB), szívizomsejteket, idegsejteket és MSC-szerű sejteket (20. ábra).



20. ábra HUES9 sejtek és differenciált származékaik jellemzése (A) HUES9 sejtek pluripotens állapotának vizsgálata áramlási citometriával és immuncitokémiai festéssel. A sejtek több mint 90%-a sejtfelszíni SSEA4 és PODXL expressziót mutat. M1: a markerre pozitív sejtpopulációt a megfelelő izotípus-illesztett kontroll mAb-ek alapján kapuvtuk (bal oldali panel). A HUES9 sejteket egér dajkasejteken tenyésztettük majd fixáltuk, permeabilizáltuk és festettük a Nanog (piros) és Oct4 (zöld) pluripotencia markerekre. A sejtmagokat Hoechst33342-vel (kék) festettük. A Nanog és az Oct4 transzkripciós faktorok nukleáris lokalizációt mutattak az őssejtekben, míg nem voltak detektálhatóak az egér dajkasejteken (itt a sejtmag jellegzetes „pöttyös” festődést mutat). (C) A HUES9 sejtek differenciált formáinak vizsgálata immuncitokémiával. A HUES9-eredetű sejttypusokat spontán differenciációs tenyészetekből mechanikusan válogattuk ki és nyolclyukú kamrákba vittük át konfokális mikroszkópiához. A mintákat fixáltuk, permeabilizáltuk, és minden sejttypushoz specifikus fehérjéket felismerő antitestekkel festettük; cTNI (zöld) a szívizomhoz, β -III tubulin (zöld) és Nestin (piros) a neurális és CD44 (zöld) a mezenchimális sejttypushoz. A sejtmagokat Hoechst33342-vel (kék) festettük.

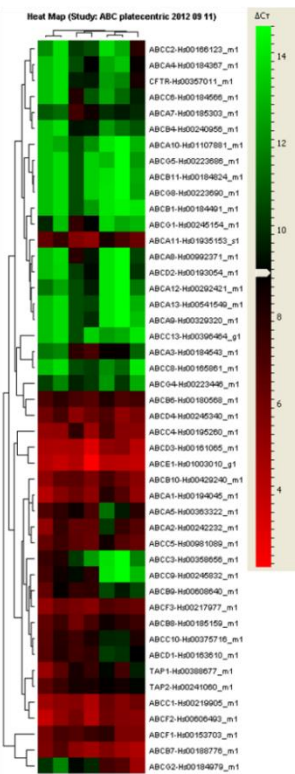
Ennek a rendszernek a legnagyobb előnye, hogy a hES sejtek és a differenciált sejtek genetikai háttere azonos, továbbá, hogy a sejt differenciálódás során a tenyésztési körülményekben sem volt jelentős változás (az extracelluláris mátrix és a tenyésztőmédium

is azonos volt), így ezek nem befolyásolják a transzporter mintázatot. Mivel a legtöbb humán ABC fehérjéhez nem állnak rendelkezésre megbízható antitestek és festési protokollok, szisztematikus elemzést csak a megfelelő mRNA expressziós szintekre lehet elvégezni. Ehhez kvantitatív RT-PCR technológiát és ABC fehérje specifikus microarray-t alkalmaztunk, és a pluripotens hESC-kból és a differenciált sejttípusokból nyert mRNA mintákat vizsgáltuk meg (21. ábra). Az array mind a 48 ABC fehérjére tartalmazott próbákat, mi az értékeléskor az multidrog ABC transzporterekre fókuszáltunk.

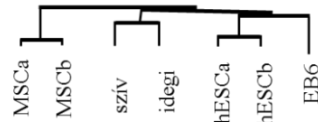
A génextpressziós adatok vizuális áttekintését hő térkép mutatja be (21.A ábra). Figyelemre méltó, hogy az ABC transzporter profilokon alapuló klaszterezés azt mutatja, hogy az összes vizsgált sejttípus rendelkezik az ABC fehérjékre jellemző expressziós mintázattal (ujjlenyomattal). A biológiai párhuzamosok (hESC és MSC) egymás mellé rendeződtek, míg a differenciálódott sejttípusok mRNA klaszterei jól elkülönültek a hESC-kétől és egymástól is. A legdifferenciáltabb sejttípus (MSC1 sejtek 80 napos differenciálódás után) biológiai párhuzamosai távol helyezkednek el a differenciálatlan sejtektől (21.B ábra). Néhány ABC fehérje hasonló (közepes) expressziós szintet mutatott minden sejttípusban, bár ezen ABC fehérjék többsége nem jól jellemzett transzporter és néhány nem is membránfehérje. Ezek az adatok arra utalnak, hogy ezek az ABC fehérjék a sejt homeosztázisának fenntartásában játszanak szerepet. Az elemzést folytatva, az ismert ABC membrán transzporterekre összpontosítva, először összehasonlítottuk az ABC transzporter mRNA-ek relatív expresszióját differenciált sejtekben a differenciálatlan hES sejtekben lévővel. Azt találtuk, hogy a legtöbb ABC transzporter szignifikánsan magasabb szinten fejeződik ki a differenciált sejttípusokban, mint a pluripotens hES sejtekben; így pl. az ABCA8, ABCC3, ABCC9 és ABCG1. Számos transzporter estében csak bizonyos sejttípusokra volt jellemző az emelkedett mRNA szint: az ABCB1 és ABCC6 magasabb volt a szívsejtekben, az ABCA4 pedig az idegsejtekben a hESC-hez képest. Érdemes megjegyezni, hogy az egyetlen ABC transzporter, amely csökkent expressziós szintet mutatott minden differenciált sejttípusban, az ABCG2 volt, ami alátámasztotta az eddigi eredményeinket, amely szerint az ABCG2 a pluripotens őssejtek transzportere. Más tanulmányokban is eltérő ABC fehérje mintázatot figyeltek meg, amikor a hESC-eket (HES2 és HES3) a hemopoietikus őssejtekkel, nem elkötelezett szöveti őssejtekkel és mezenchimális őssejtekkel hasonlították össze (PMID: 20836839). Azt is kimutatták, hogy az mRNA expresszió szintje eltérő a hESC-ben és a hESC-eredetű hMSC-ben [142]. Ez a sejttípus-specifikus expresszió is jelzi e fehérjék lehetséges szerepét a szöveti differenciációban. A hES sejt-alapú modell lehetővé teszi fiziológiai szerepük további jellemzését és a gyógyszerfejlesztésben való felhasználhatóságukat [143]. A következő

kísérletekben fehérjeszinten vizsgáltuk a legfontosabb ABC transzporterek expresszióját. A specifikus és megfelelően reaktív antitestek alkalmazása döntő kérdés ezekben a kísérletekben, ezért csak olyan ellenanyagokat használtunk, amelyek megbízhatóan és specifikusan felismerik az adott transzporter fehérjét.

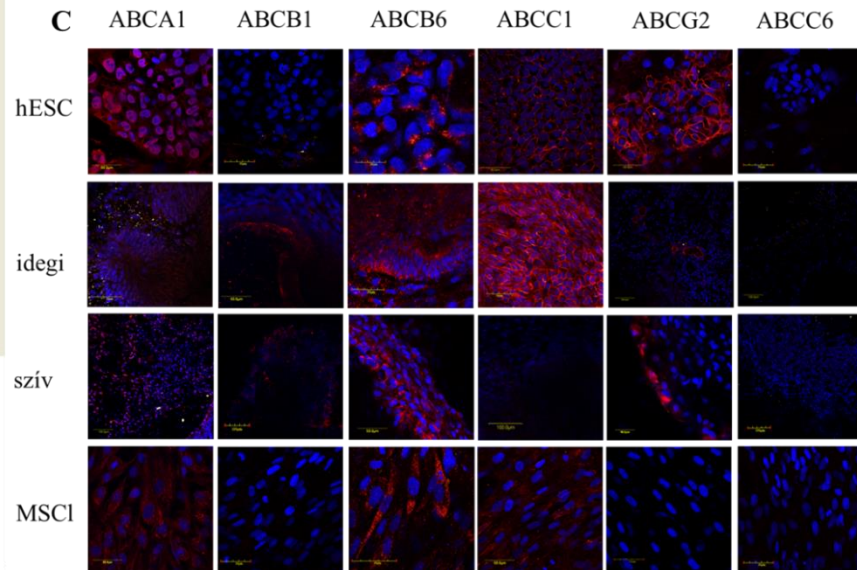
A



B



C



21. ábra ABC fehérjék expressziójának elemzése HUES9 sejtekben és differenciált származékaikban. (A) A humán ABC fehérjék gén expresszióinak hő térképe; 4 sejtípus 7 mintájában (a és b hESC, szív-, neurális és MSCls a és b) és a 6 napos EB tenyésztetben (a differenciált sejtípusok közös progenitorai). Az ABC gének az y tengelyen, a 7 minta az x tengelyen biológiai párhuzamosokkal („a” és „b”) vannak rendezve. A színek a magas (dCt = 4, világospiros) és a közepes (fekete) génexpressziótól az alacsony (dCt = 14, világoszöld) génexpresszióig terjed a kiválasztott háztartási génekhez képest. (B) 7 minta hierarchikus klaszterezése, amely lehetővé teszi a minták differenciáltsági állapot alapján történő elkülönítését. (C) A HUES9 sejteket egér dajkasejteken tenyésztettük, a HUES9-eredetű sejtípusokat mechanikusan válogattuk ki és zselatinnal fedett nyolclyukú konfokális kamrában tenyésztettük két napon át a festés előtt. A mintákat az ABCA1, ABCB1, ABCB6, ABCC1, ABCG2 és ABCC6 fehérjéket (piros) elleni specifikus antitestek segítségével, a sejtmagokat Hoechst33342-vel (kék) festettük. A mintákat Olympus FV500-IX konfokális lézerpáztázó mikroszkóppal vizsgáltuk.

Immunfestési adataink (21.C ábra) is azt mutatták, hogy a korábbi eredményeknek megfelelően a differenciálatlan hES sejtekben a legjellemzőbb multidrog transzporter az ABCG2 fehérje. Az ABCC1 és ABCA1 sejt felszíni, míg az ABCB6 intracelluláris

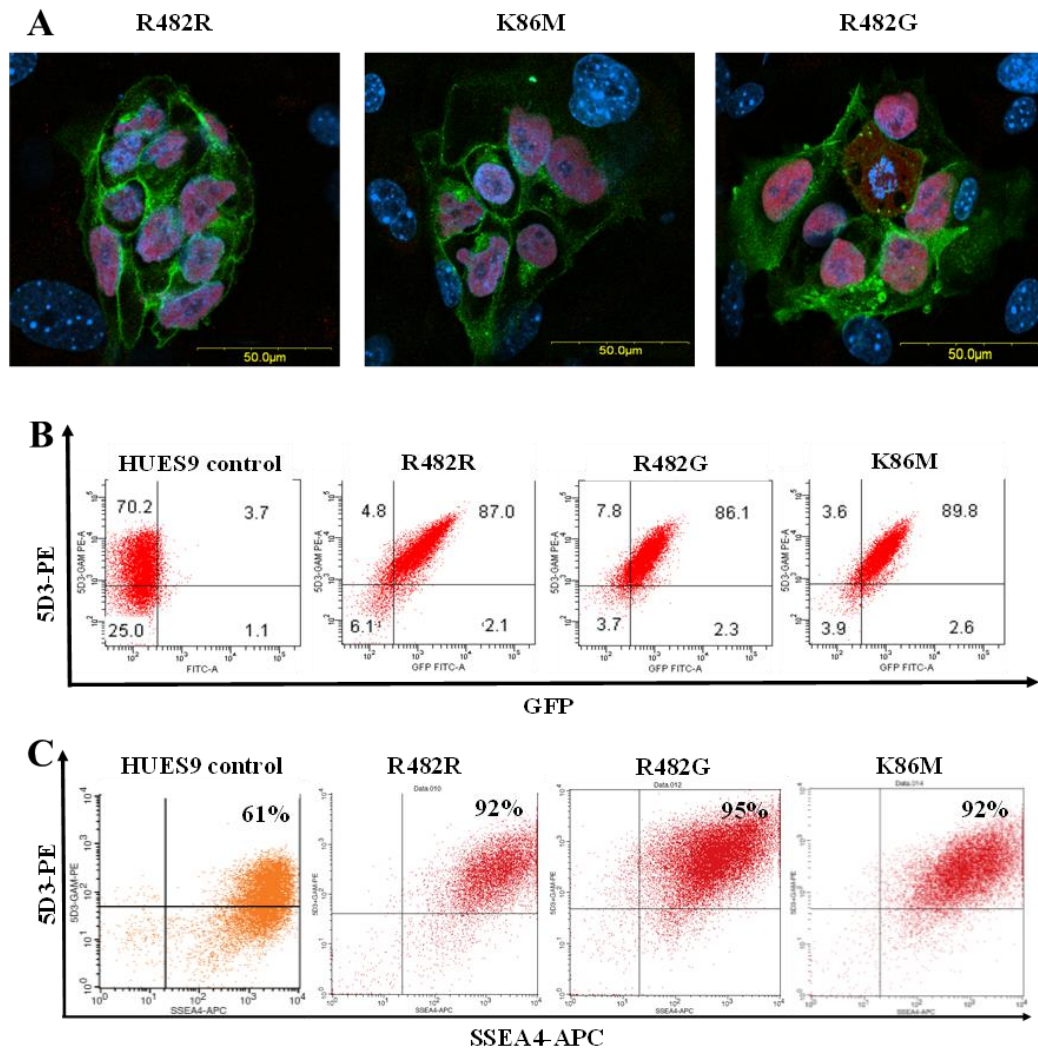
expressziót mutatott minden vizsgált sejttípusban. Az ABCB1-et és ABCC6-ot a hES sejtekben nem tudtuk kimutatni. A hES-eredetű idegsejtekben az ABCB6 és az ABCC1 expresszió kivül, bizonyos régiókban az ABCA1 és az ABCB1 expresszióját is megfigyeltük. A kardiomiocitákban magas szintű ABCB6 expressziót, alacsonyabb ABCB1 és ABCA1 expressziót figyeltünk meg. Az MSC-kben az ABCA1, ABCB6 és ABCC1 esetében domináns, de többnyire intracelluláris expressziót figyeltünk meg, míg az ABCB1 és ABCG2 esetében itt nem volt mérhető expresszió. Fehérjeszintű vizsgálataink is megerősítették, hogy az ABC transzporterek eloszlása sejttípus specifikus és jellemző lehet az ES sejtekből differenciáltott sejttípusok esetében is (az áramlási citometriás elemzéseinket itt nem mutatom be, de összhangban voltak az immunfestések eredményeivel).

Érdekes módon a szív- és idegszövetminták külső régióiban egyes sejtek ABCG2 expressziót is mutattak, ami utalhat az ABCG2 szöveti határokon való megjelenésére. Az ABCB6, ami a toxikus hem-származékok elleni védelemben játszhat szerepet, és az adatok szerint a mitokondrium mellett/helyett a sejtek plazmamembránjaiban is megtalálható [144, 145], itt minden vizsgált sejttípusban csak intracelluláris expressziót mutatott. Az ABCC6 fehérje immunfestési adatait is feltüntettük, mivel ez a transzporter, úgy tűnik, fontos szerepet játszik a szívszövetek homeosztázisában [146]. Az ABCC6 expresszióját azonban egyik vizsgált hESC-eredetű sejttípusban sem tudtuk kimutatni. Mivel az ABCC6 emberben elsősorban a májban és a vesében expresszálódik [147] és később kiderült, hogy az ABCC6 mutációk által okozott szívproblémák hátterében inkább az ABCC6 májban betöltött funkciójának kiesése áll [148], ez az eredményünk nem is annyira meglepő. Ezek a vizsgálatok fontos információkat nyújtottak az ABC fehérjék expressziós mintázatának felderítésében a humán pluripotens emberi őssejtekre és azokból differenciáltható sejttípusokra vonatkozóan. További vizsgálatokra van azonban szükség a szövetek és szervek közötti eloszlás (ujjlenyomat) megállapításához, valamint a kulcsfontosságú humán ABC transzporterek sejtekben betöltött funkcióinak megértéséhez. A pluripotens őssejtekből létrehozható háromdimenziós rendszerek (szferoidok és organoidok) alkalmazása tovább segítheti ezt a munkát, mert elősegíti a sejtek polarizációját és ezzel a transzporterek megfelelő pozícióba való jutását, illetve a sejt-sejt közötti kapcsolatok létrejöttét, amelyektől a transzporterek funkciója is nagyban függ [143].

4.2.4. *Hogyan használható ez a tudás drog rezisztens szövetek tervezésében?*

(vonatkozó fontosabb közlemény: Erdei et al. PLoS One. 2018)

A következő kérdésünk az volt, hogy a stabil ABCG2 expresszió lehetővé teszi-e drog rezisztens humán pluripotens őssejtek és őssejtből származó szövetek létrehozását. Hogy ezt a kérdést megválaszoljuk, egy megfelelően címkézett ABCG2-t alkalmaztunk, amely könnyen követhető és láthatóvá válik élő sejtekben is. Azt a GFP-ABCG2 fúziós fehérjét használtuk, amelyről kutatócsoportunk előzőleg kimutatta, hogy megfelelően processzált és működőképes különböző sejtípusokban [149]. A GFP-ABCG2 stabil expresszióját hES sejtekben, az SB transzpozon rendszer és egy mesterséges promotor (CAG) használatával terveztük, mivel ezzel a rendszerrel már sikeresen vittünk be GFP-t az őssejtekbe [116]. Az ABCG2 transzporterben számos mutációt leírtak, amelyek jelentősen befolyásolják a fehérje a működését. Először gyógyszerelektált rákos sejtvonalakban találták meg a mutáns fehérjét, később erről az R482G-ABCG2 variánsról kimutatták, hogy eltérő szubsztrát felismerő és szabályozási tulajdonságokkal rendelkezik a vad típusú fehérjéhez képest [150, 151], ami fokozott rezisztenciát biztosít a toxikus ágensekkel, pl. doxorubicin szemben. Elkészítettük a vad típusú, az R482G és kontrollként a nem funkcionális K86M ABCG2 variánsok GFP fúziós konstrukcióit. A HUES9 sejteket transzfektáltuk, majd a GFP-ABCG2 variánsokat stabilan expresszáló hES klónokat puromicinnel szelektáltuk, áramlási citometriával szétválogattuk, végül a homogénean expresszáló sejtsomókat mechanikusan válogattuk ki. A transzgen 4-8 kópiáját tartalmazó klónokat használtuk a további vizsgálatokban. A konfokális mikroszkópos vizsgálatok azt mutatták, hogy a GFP-ABCG2 fehérje viszonylag egyenletesen fejeződik ki a HUES9 sejtekben, és bár megfigyelhető volt az intracelluláris lokalizáció is, a hES sejtek plazmamembránjában is látható az expresszió mindhárom ABCG2 variáns esetében (22.A ábra). Az Oct4 festés azt mutatta, hogy az őssejtsomók pozitívak erre a pluripotencia markerre nézve, míg az egér dajkasejtek (pöttyözött magfestődés) nem mutattak Oct4 festődést. Az 5D3, sejt felszíni anti-ABCG2 antitest használatával végzett áramlási citometriás mérések szintén megerősítették a GFP-ABCG2 viszonylag magas plazmamembrán lokalizációját (az 5D3 ellenanyag külső epitópot ismer fel, így a plazmamembrán lokalizáció jól vizsgálható flow citométerrel [152]) a transzgenikus klónokban, amelyek magas expressziót mutattak az SSEA4 pluripotencia markerre és a GFP riporterre is (22.B és C ábra).

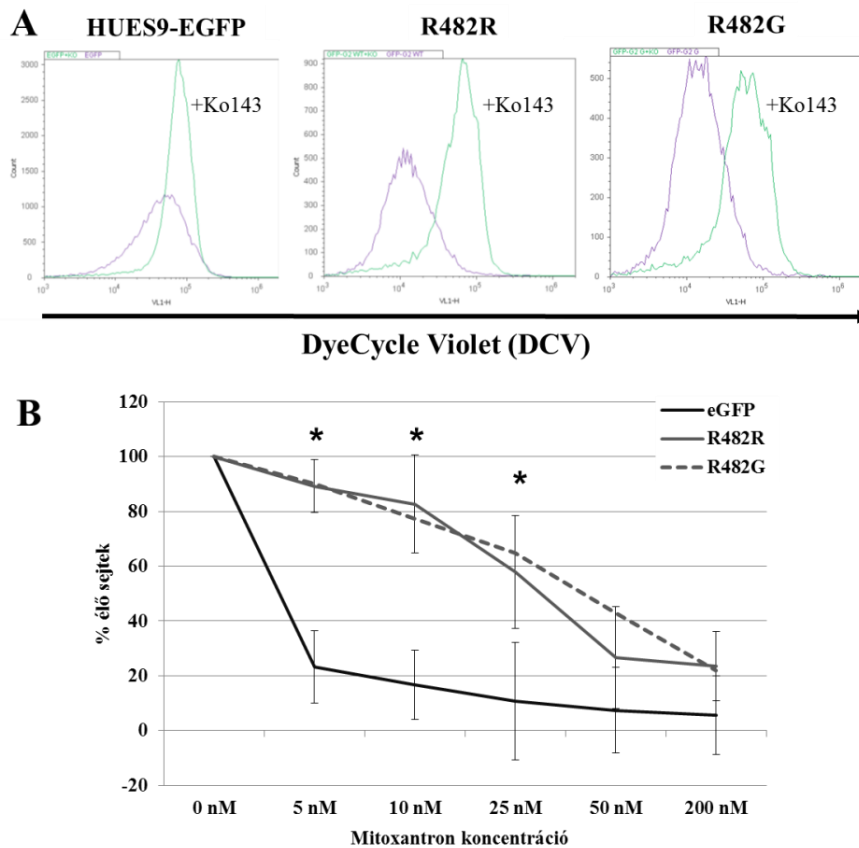


22. ábra GFP-vel címkézett ABCG2 variánsok kifejeződése HUES9 sejtekben. (A) A GFP-ABCG2 variánsokat (zöld) kifejező HUES9 sejtsomók konfokális képei, a HUES9 sejteket egér dajkasejteken tenyésztjük. Az Oct4 immunfestése (piros) jelzi a pluripotencia megőrzését a HUES9 sejtekben. A sejtmagokat DAPI-val (kék) jelöltük meg. (B) Kiindulási és GFP-ABCG2 variánsokat expresszáló HUES9 sejtek áramlási citometriás analízise. A sejteket monoklonális anti-ABCG2 antitesttel (5D3) és fikoeritrinhez (PE) kapcsolt anti-egér IgG2b-vel jelöltük. A GFP-ABCG2 zöld fluoreszcenciáját az 5D3-PE vörös fluoreszcenciával együtt ábrázoltuk. (C) Az SSEA4 pluripotencia marker áramlási citometriás elemzése a kiindulási (kontroll) HUES9 sejtekben és a GFP-ABCG2-t variánsokat expresszáló klónokban. Az ábrákon a monoklonális anti-ABCG2 antitesttel (5D3-PE) és az APC-hez konjugált anti-SSEA4-gyel festett sejtek láthatók. A kontroll HUES9 sejtek, a GFP-ABCG2-R482R, GFP-ABCG2-K86M és GFP-ABCG2-R482G variánsokat expresszáló HUES9 sejtek láthatók.

Miután a klónok spontán differenciációs képességét is bizonyítottuk és megállapítottuk, hogy nincs szignifikáns különbség a GFP-ABCG2-hES és a kiindulási hESC-k spontán differenciálódási képessége között (adatok az eredeti cikkben [122]), elmondhatjuk, hogy a

GFP-ABCG2 variánsok túltermelése nem változtatott az őssejtek pluripotens állapotán, ami megfelelt az elvárásainknak.

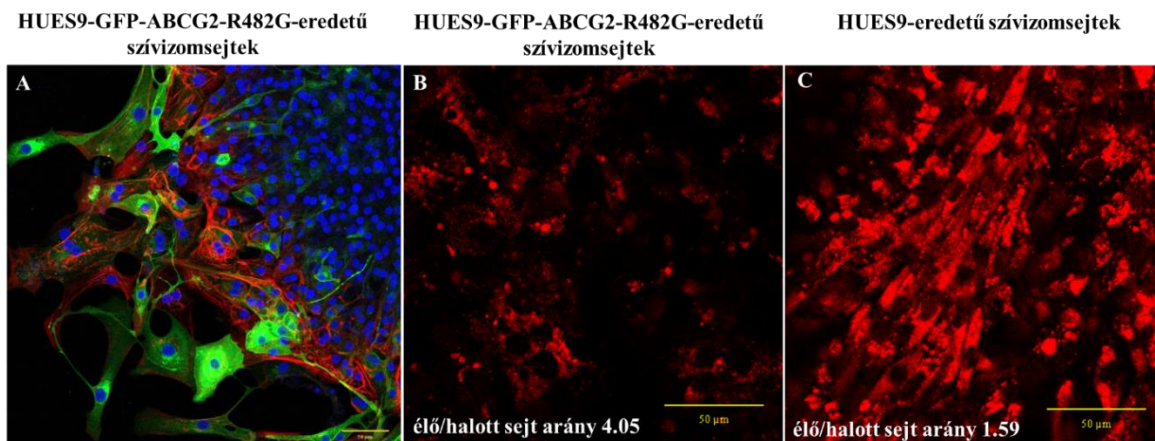
A GFP-ABCG2-hESC-k alapvető jellemzőinek vizsgálata után a GFP-ABCG2 funkcióját vettük górcső alá a pluripotens sejtekben. A következő mérésekben a funkcionális változatokra koncentráltunk; a GFP-ABCG2wt és a GFP-ABCG2 R482G túltermelő klónokat egy eGFP-t kifejező HUES9 klónhoz hasonlítottuk (hogy a GFP jelenlétéből adódó fluoreszcencia hasonló legyen a mérések során). Amint azt az előzőekben bemutattuk, a GFP-ABCG2 nagy része a plazmamembránban lokalizálódik, így a következő kísérletekben az ABCG2 transzport funkcióját egy ismert szubsztrát, a DyeCycleViolet (DCV) fluoreszcens magfesték kizárásának mérésével vizsgáltuk [153, 154]. A 23.A ábrán bemutatott kísérletekben a hESC-eket 100 nM DCV-vel inkubáltuk 16 órán át, az ABCG2-specifikus inhibitor, a Ko143 jelenlétében vagy hiányában. A DNS-hez kötött DCV fluoreszcens jelét áramlási citometriás analízissel követtük. Eredmények szerint a GFP-ABCG2wt-t vagy GFP-ABCG2-R482G-t kifejező hESC-k DCV-kizárása szignifikánsan nagyobb volt, mint a kiindulási őssejteké. A 23.B ábrán mutatjuk, hogy a funkcionális ABCG2 túltermelése a HUES9 sejtekben védőhatású a mitoxantron (MX) sejtpusztító hatása ellen. Ezekben a kísérletekben a GFP-ABCG2-hESC-eket és az eGFP-hES sejteket 5-200 nM MX-t tartalmazó tápban tartottuk, és a sejtek túlélését áramlási citometriával mértük. Eredményeink azt mutatják, hogy míg az GFP-hES sejtek alacsony MX koncentráció mellett elpusztulnak, a vad típusú vagy GFP-ABCG2-R482G fehérjéket túltermelő hESC-k sokkal magasabb koncentrációban is túlélnek az MX kezelést. Így viszonylag kis mennyiségű funkcionális ABCG2 membránfehérje stabil termelésével lehetővé válik gyógyszer/toxin-rezisztens pluripotens emberi őssejtek és származékaik létrehozása gyógyszerfejlesztési vagy akár terápiás célokra is.



23. ábra Az ABCG2 funkcionális vizsgálata eGFP-HUES9-ben (kontroll) és GFP-ABCG2-t expresszáló sejtekben (A) A GFP-ABCG2 fehérje variánsok transzportfunkciójának vizsgálata HUES9 sejtekben DCV festék felvétel mérésével. A DCV fluoreszcenciát a GFP-ABCG2 R482R (vad típusú) és R482G (szubsztrát mutáns) variánsait expresszáló sejtekben mértük. A lila hisztogram a DCV jelét mutatja a kontroll sejtekben, a zöld hisztogram pedig a DCV jelét az ABCG2 szelektív gátlószerével (Ko143) kezelt sejtekben. Transzport aktivitási faktorok: $F_{eGFP}=56.65\pm 10.54$; $F_{R482R}=82.22\pm 1.86$ $p=0.014$; $F_{R482G}=78.60\pm 2.26$ $p=0.024$. (B) Mitoxantron citotoxicitásának elemzése eGFP-HUES9 (kontroll) sejtekben és GFP-ABCG2 variánsokat kifejező HUES9 sejtekben. Az eGFP-t és GFP-ABCG2-t expresszáló HUES9 sejtek túlélését 5-200 nM Mitoxantron (MX) jelenlétében áramlási citometriával mértük. Az elhalt és élő sejtek arányát a propidium-jodid festődés alapján számítottuk ki, és a kezeletlen sejtekre normalizáltuk. A görbék 3 független kísérletből származnak, az átlagot \pm S.D mutatják. A szignifikáns különbségeket (Student t-teszt, $P<0,01$) az eGFP-t és az ABCG2-variánsokat expresszáló klónok túlélésében csillagok jelzik.

Az antraciklinek, köztük a doxorubicin (DOX) rendkívül hatékony rákellenes gyógyszerek, különösen az emlőrák és a rosszindulatú hematológiai daganatok kezelésekor használják [155, 156]. Másrészt ezek a gyógyszerek a rákot túlélőknél a súlyos szív működési zavarok vezető okai [157]. Humán pluripotens őssejt eredetű kardiomiociták esetében kimutatták, hogy a DOX kezelés dóziszfüggő növekedést okoz az apoptotikus és nekrotikus sejthalálban, a reaktív oxigéngyökök termelődésében, a mitokondriális diszfunkcióban és

az intracelluláris kalcium koncentrációban [158]. Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk az ABCG2 túltermelés esetleges védő hatását, először működő szívizomtelepeket kellett létrehozni a GFP-ABCG2 variánsokat kifejező őssejt klónokból. Az itt bemutatott kísérletekhez az R482G ABCG2 variánst választottuk ki, mert ennek magasabb a transzport aktivitása a DOX-ra vonatkozóan [150]. A 24.A ábrán látható konfokális mikroszkópos felvételen a GFP-ABCG2-R482G hESC-kből származó kardiomiociták együtt expresszálják a cTnI-t és a GFP-ABCG2 fehérjét. Mindezek az adatok azt mutatják, hogy a GFP-ABCG2 stabil expressziója nem befolyásolja szignifikánsan a kardiomiociták differenciálódását a HUES9 sejtekből, és ezekben a sejtekben megmarad a pacemaker és a kontraktilis aktivitás. A GFP-ABCG2-R482G-t túltermelő hESC-klónból dobogó szívizomtelepeket izoláltunk mechanikusan, majd vizsgáltuk a túltermelt GFP-ABCG2-R482G potenciális védőhatását a doxorubicin (DOX) ellen. Azt találtuk, hogy a kiindulási HUES9 sejtekben nagyobb volt a sejthalál és a DOX felhalmozódás is (a DOX fluoreszcens, így a sejtekben jól kimutatható), mint az ABCG2-R482G-t kifejező párjaikban (24.B és C ábra).



24. ábra (A) A szív troponin I (piros) és GFP-ABCG2 (zöld) együttes immunfestése HUES9 sejtektől differenciált szívizomsejtekben. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük. (B-C) HUES9 sejtekből származó dobogó szívizom telepeket doxorubicinnel (DOX, 3 μ M) 16 órán át kezeltünk. A sejtekben a DOX felhalmozódást konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk a GFP-ABCG2-R482G-t túltermelő HUES9 sejtektől differenciált szívizomsejtek (B) illetve kiindulási HUES9 sejtektől differenciált szívizomsejtek (C) esetében. Az elhalt és élő sejtek arányát a propidium-jodid akkumuláció alapján számítottuk ki, és a kezletlen sejtekre normalizáltuk. Az élő/halott sejtek aránya 1,59 (élő sejtek: 61,32 % \pm 41,11 %; elhalt sejtek: 38,68 % \pm 36,77 %), míg ez az arány a HUES9-GFP-ABCG2-R482G eredetű kardiomiocitákban 4,05 volt (élő sejtek: 80,19% \pm 13,85%; elhalt sejtek: 19,80% \pm 11,30%). Az értékek 3 független kísérlet átlagát \pm S.D. tükrözik.

Mivel a fiziológias humán szívizomsejtekben az ABCG2 transzporter gyakorlatilag hiányzik [159, 160], jelenlegi eredményeink segíthetnek a toxikus anyagokkal szemben védett génmódosított szívsejtek létrehozásában.

Az ABC transzporterekkel, és kifejezetten az ABCG2-vel kapcsolatos vizsgálataink nyomán közelebb jutottunk az ABC transzporterek szerepének tisztázásához a pluripotens őssejtekben és differenciált származékaikban. Elfogadottá vált, hogy az ABCG2 kifejeződik a pluripotens állapotú sejtekben [161-164], sőt arra is használható, hogy a visszaprogramozás közben kiválogassák azokat a sejtsomókat, amelyek *bona fide* őssejteké válnak majd [161]. Eredményeinkre támaszkodva az ABCG2 sejtvédő hatását szintén megerősítették többféle stressz és sejtípus esetében is [165, 166]. Az így megszerzett tudással tüdőrák sejtekben is vizsgáltuk a GFP-jelölt ABCG2 funkcióját [167], ezzel elsőként létrehozva egy olyan fluoreszcens riporter vizsgálati rendszert, amellyel élő sejtekben lehet az ABCG2 transzporter endogén szabályozását követni. Ugyanezt a riporter rendszert létrehoztuk humán embrionális őssejtekben is, azonban a fluoreszcencia olyan alacsony volt, hogy élő sejtekben nem lehetett követni. Az ABCG2 stresszvédő hatásának további vizsgálatát humán pluripotens eredetű neurális progenitor sejteken Dr. Erdei Zsuzsa folytatta (egy PD OTKA keretében, szakmai irányításom mellett). Ezen munkák mellett az ABCG2 transzkripció szabályozásának feltárásában együttműködtünk Dr. Orbán Tamás kutatócsoportjával [168, 169]. A doxorubicin szívtoxikus hatását is tovább vizsgáltuk Dr. Földes Gáborral és közös PhD hallgatónkkal, Berecz Tündével, bizonyítva a YAP-TAZ útvonal fontosságát a folyamatban [170]. Ezeknek a munkáknak a bemutatása azonban túlmutatna a dolgozat keretein.



*Hollerbach Emil grafikája

4.3. Milyen a pluripotens őssejtek kalcium szignalizációja és milyen módszerekkel érdemes ezt vizsgálni?

Az *in vitro* jelátviteli kutatások elsősorban rákos sejtvonalakon folynak, ami a tumoros megbetegedések megértésében és gyógyítási lehetőségeinek feltárásában jelentős fejlődést hozott. A rákos sejtekben azonban a jelátviteli útvonalak sérülhetnek, vagy a részvételük a sejtválasz kialakulásában jelentősen megváltozhat, így a fiziológiás folyamatok megértéséhez más megközelítések is szükségesek. A humán pluripotens őssejtek új lehetőséget jelentenek a jelátvitel utak feltárásában, a fiziológiás sejtműködés és a differenciálódás során is. Amikor kutatásainkat ebben az irányban elkezdtük, igen kevés adat állt rendelkezésre a kalcium jelátviteli utakról és a különböző ligandumokra vagy stresszhelyzetekre adott kalciumválaszokról pluripotens őssejtekben és azok differenciált utódaiban. Ez részben annak volt köszönhető, hogy e sejtípusok tenyésztése speciális körülményeket és szaktudást igényel, továbbá a szuboptimális tenyésztési körülmények okozta részleges differenciálódás során gyorsan megjelenő morfológiai és funkcionális változások is nehezítik a mérések értelmezését és reprodukálhatóságát. Ezen felül az intracelluláris kalciummérések módszertani problémái sem könnyítették a kutatók dolgát.

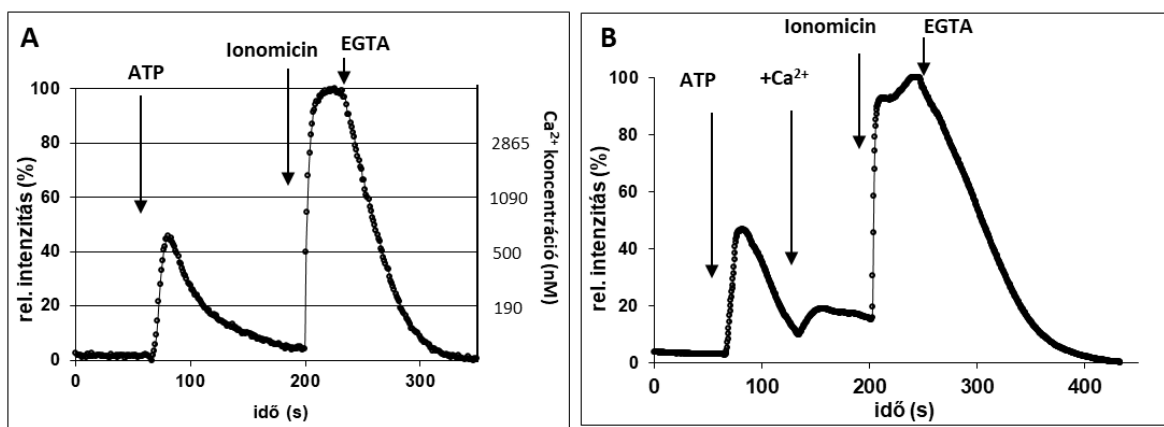
4.3.1. Kalcium szignálok humán pluripotens őssejtekben

(vonatkozó fontosabb közlemény: Apáti et al. Mol Cell Endocrinol. 2012)

Az első tanulmányunk bevezető részében összefoglaltuk a humán pluripotens őssejtekben és differenciált származékaikban addig megjelent, kalcium jelátvitellel kapcsolatos adatokat. Áttekintettük a különféle vizsgálati módszereket és elemeztük a vizsgálatok előnyeit és hátrányait. Érdekes módon már az egér embrionális őssejtekről is csak kevés adat állt rendelkezésre [171-173], de a humán pluripotens őssejtekről csupán egy részeredmény volt elérhető. Ebben a hESC-kből differenciáltatott neuronok kalcium jelátviteli útjait vizsgálva megállapították, hogy válaszul az ATP és a Dopamin D(2) receptor aktivációra a differenciálatlan hESC-k az intracelluláris raktárakból kalciumot mobilizáltak, miközben nem volt megfigyelhető a raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlás [174]. Hogy ezt az információhiányt pótoljuk, első munkákban a kalcium jeleket vizsgáltuk hESC-kben és differenciált származékaikban; mezenchimális őssejt-szerű (MSCI) sejtekben és szívizomsejtekben, Fluo-4 fluoreszcens kalciumindikátor és konfokális mikroszkópia segítségével. Itt a pluripotens őssejtek példáján mutatom be a mérési technikát és a kapott eredményeket.

Ahhoz, hogy a kalcium jelek dinamikáját részletesebben megvizsgáljuk, kalibrációt alkalmaztunk; a mérés végén a maximális fluoreszcenciát (F_{max}) magas koncentrációjú (5

μM) ionomicin jelenlétében, a nem komplexált festék maradék fluoreszcens jelét (F_{min}) a kalciumot eltávolító EGTA hozzáadása mellett mértük. A raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlást (SOCE) úgy vizsgáltuk, hogy az indukáló szert gyakorlatilag kalciummentes tápközegbe ($0,1 \mu\text{M}$ szabad kalcium) adtuk hozzá a sejtekhez, majd a jel lecsengése után a kalcium szintet 2 mM -ra emeltük CaCl_2 hozzáadásával. A 25. A ábrán a celluláris kalciumkoncentráció százalékos növekedését mutatjuk be, valamint a sejt szabad kalciumszintjeit a Fluo-4 $K_d\text{-Ca}^{2+}$ -értéke ($0,7 \mu\text{M}$, citoplazmatikus körülmények között) alapján számolva (ez csak közelítő érték mivel a citoplazmatikus K_d érték sejtípustól függően változhat). A B panel a raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlást (SOCE) demonstrálja.



25. ábra Az A és B paneleken látható, hogy a HUES9 sejtek kifejezett kalcium jelet mutattak az ATP-re mind külső kalcium jelenlétében, mind annak hiányában. Az ATP adás utáni gyors citoplazmatikus kalciumszint emelkedés a raktár ürülése által működtetett kalciumcsatornák működését jelzi a HUES9 sejtekben.

A következő táblázatban (3. táblázat) néhány jól jellemzett ligandum hatását mutatom be HUES9 és MSC1 sejtekben. Esősorban olyan „ősi” típusú receptorfajtákra koncentráltunk, amelyek az eukariótákban konzerváltak és így potenciálisan a differenciálatlan sejtekben is jelen vannak. Ezek közé tartozott az LPA, ami GPCR-Gq útvonalon keresztül indukál kalcium jelet [175], a trombin és a tripszin, amelyek proteáz-aktivált receptorokon (PAR) keresztül hatnak [176], a hisztamin, ami a H1 receptor aktiválásán keresztül mobilizálja a kalciumot [177, 178], az angiotenzin II, ami 7 TM típusú AT1 receptort aktivál [179] és a GABA, amelyről korábban bemutatták, hogy egér ESC-ben indukálja a kalcium jelátvitelt [172].

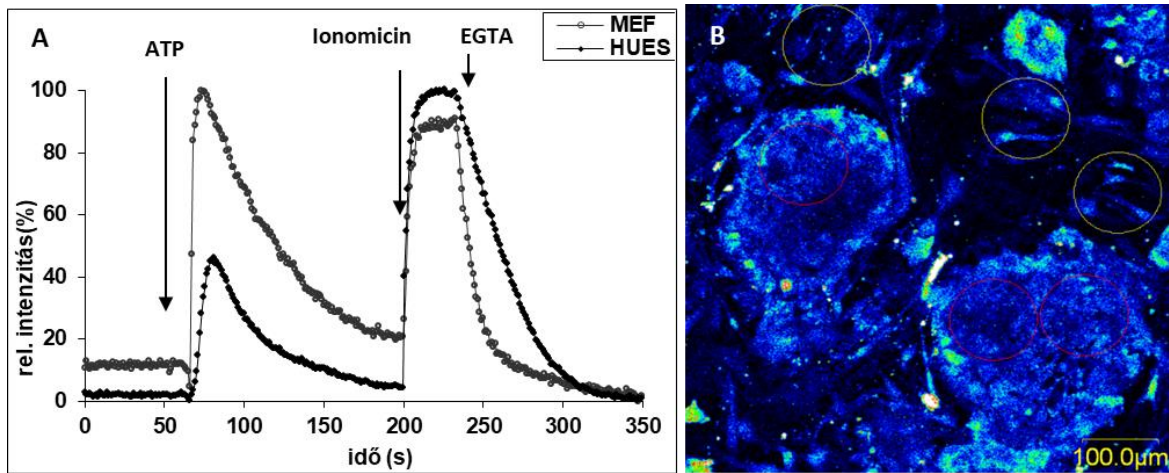
3. táblázat Különböző indukálószeretek által kiváltott kalcium jelek összefoglalása HUES9 (hESC) és HUES9 sejtekből származó mezenchimális őssejt-szerű (MSCI) sejtekben.

	ATP 100 μM	LPA 10 μM	Trombin 5 U/ml	Tripszin 2,5 μg/ml	Hisztamin 100 μM	Angiotenzin 10 μM	GABA 1 mM	SOCE
HUES	+	+	-	+	-	+	-	+
MSCI	-	+	+	+	+	+	-	+

SOCE: a raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlás (Store Operated Calcium Entry).

A kapott eredmények összefoglalásaként elmondható, hogy az ATP csak a hESC-kben indukált kalcium jelet, az LPA és a tripszin gyors és kifejezett kalciumjeleket eredményezett mind a HUES9, mind az MSCI sejtekben. Az angiotenzin II kismértékű kalciumválaszt indukált a HUES9 sejtekben, és sokkal nagyobb az MSCI sejtekben. A hisztamin teljesen hatástalan volt a HUES9 sejtekben, míg erőteljes kalciumjelet indukált az MSCI sejtekben, amit a sejtek nagy részében oszcilláló kalcium jelek követtek. A trombin vagy a GABA még viszonylag magas koncentrációban sem váltott ki kalcium jelet a hES sejtekben, míg a trombin az MSCI sejtekben kalcium jelet okozott. A raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlást mindkét sejttypusban detektálni tudtuk (3. táblázat és 25.B ábra). Ez az eredményünk nincs összhangban az előzőleg említett vizsgálattal [174], ahol azt találták, hogy ATP adását követően csak a belső kalcium raktárakból mobilizálódik a kalcium. Mivel a raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlás nagyon általános fiziológias funkciókhoz köthető (mint például a sejtosztódás lásd [180]) és egér embrionális őssejtekben bizonyították is a SOCE és a folyamatban résztvevő fehérjék jelenlétét [181], így valószínűsíthető, hogy az általunk bemutatott eredmények közelebb állnak a fiziológias folyamatokhoz, mint azt korábban leírták [174].

A továbbiakban bemutattuk, hogy a dajkasejteken tenyésztett pluripotens sejtek esetében a dajkasejtben is kiváltható kalcium jel, ami dinamikájában különbözik az őssejt jeleitől (26.A ábra). Ezért azt javasoltuk, hogy ezeket a jeleket morfológia alapján elkülönítve érdemes vizsgálni, azaz az őssejt jeleinek vizsgálatához csak az őssejt-csomókat kell figyelembe venni (26.B ábra).



26. ábra ATP-indukált kalcium jel humán embrionális őssejteken (HUES9) és egér dajkasejteken (MEF) sejtekben. A kalcium jeleket Fluo-4-tel töltött sejtekben mértük, konfokális mikroszkóp segítségével. (A) A HUES9 és MEF sejtek kalciumjeleinek kalibrált értékei a B panelen látható kijelölés alapján. Ha a kalcium jelek maximumát (ionomicin és kalcium jelenlétében) hasonló szintre állítjuk, az ATP-re adott jel a MEF sejtek esetében (sárga jelölés) nagyobbak, mint a HUES9 sejtekben (piros jelölés). Az ATP (100 μ M), ionomicin (5 μ M) vagy EGTA (a 10 mM) hozzáadását nyilak jelzik.

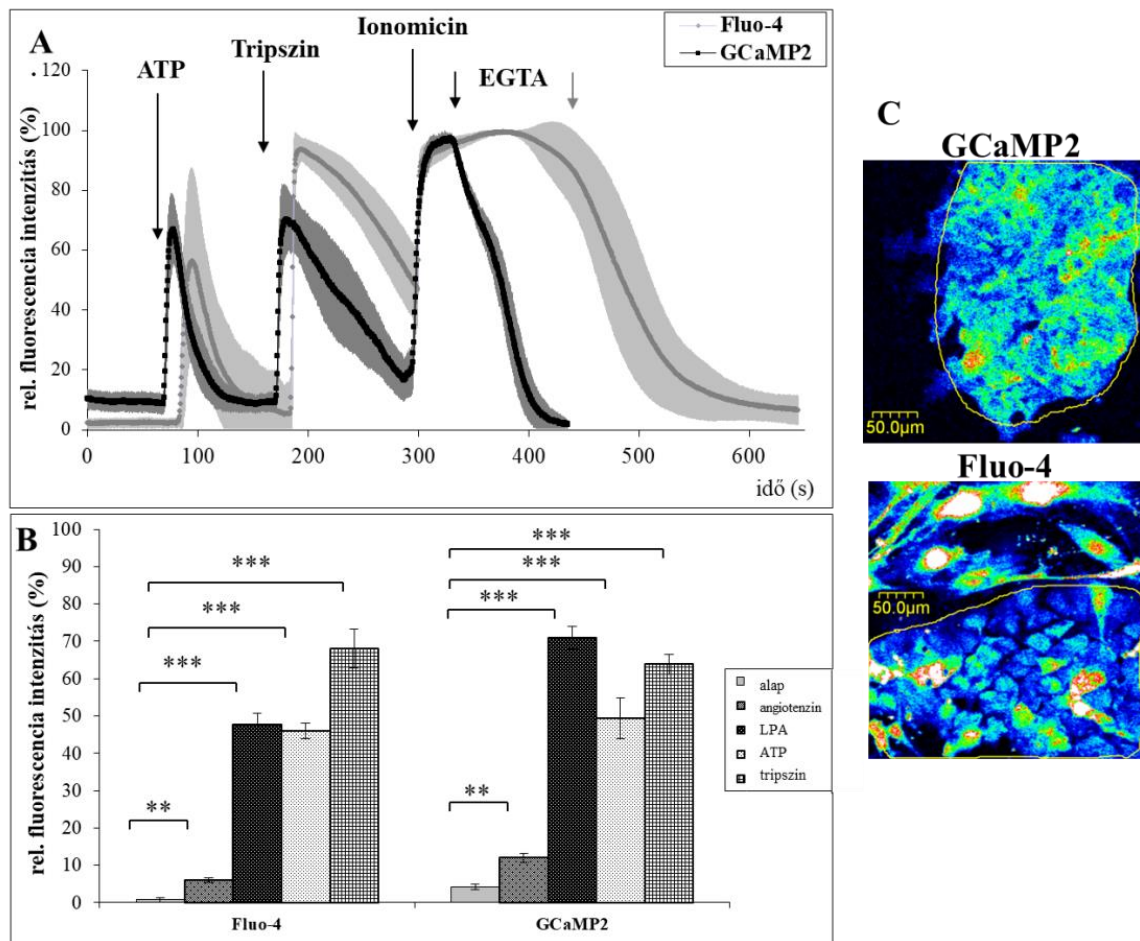
A mikroszkópos technika arra is lehetőséget nyújtott, hogy elkülönítsük a különböző sejtalkotókban megjelenő kalciumjeleket. Így azt is megmutattuk, hogy a Fluo-4 magi felhalmozódása nem változtatja a különböző indukálószerre adott válasz lefutását (lásd még [99]); a citoplazmában mérhető jelek kisebb intenzitásúak ugyan, azonban a lefutásuk pontosan megfelel a sejtmagban mérhető jeleknek (és így a kettő összegezve is reprezentálja a kalcium jeleket).

Összefoglalva elmondhatjuk, hogy sikerült a Fluo-4 fluoreszcens kalciumindikátor és a konfokális mikroszkópia segítségével megvalósítani a kalcium szint érzékeny és megbízható mérését hES és MSC1 sejtekben. A kalciumérzékeny festékek alkalmazásának azonban hátrányai is vannak, mint a töltési eljárás reprodukálhatósága, az acetoximetilészterhez (AM) csatolt festék hasításkor megjelenő termék toxicitása, a festék egyenetlen eloszlása a sejtek között és egy adott sejten belül is, a fotoelhalványodási (bleaching) problémák, és a festékek különböző dinamikus tartományai, amelyek a mérések sztenderdizálását nehezítik. Az egyik lehetséges megoldás ezen problémák leküzdésére a genetikailag módosított kalcium-érzékelők használata. Ezért a következő kísérleteinkben a Fluo-4 kalciumindikátor mellett, a kalcium-érzékelő fehérjék egy változatát, a GCaMP2-t is használtuk, hogy összehasonlítsuk a két kalciumindikátor segítségével mérhető jeleket.

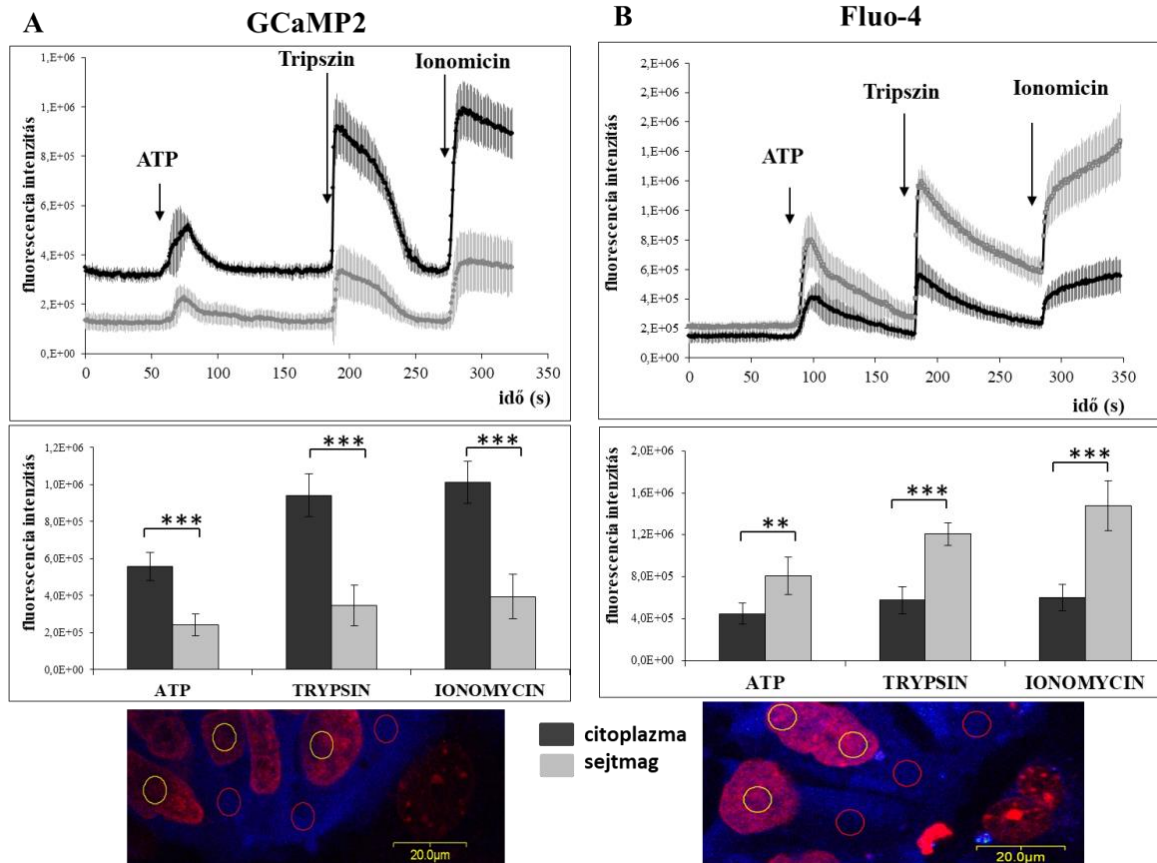
4.3.2. *Kalcium szignálok mérése genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével*

(vonatkozó fontosabb közlemény: Apáti et al. Cell Signal. 2013)

A hESC-kbe a GCaMP2 stabil kifejeződését SB transzpozonos génbeviteli technikával valósítottuk meg, mivel ez a módszer hatékonynak bizonyult a korábbi vizsgálatainkban is [116]. GCaMP2-t stabilan kifejező sejt vonalakat állítottunk elő (hESC-GCaMP2) és megállapítottuk, hogy a transzgén sem a pluripotens tulajdonságokat (morfológia (lásd 27. C ábra felső panel), SSEA4, Oct4 és Nanog kifejeződés) sem a differenciációs képességet nem változtatta meg. Ezután a jól ismert kalcium-mobilizáló szerek által kiváltott kalcium jeleket mértük, mind a GCaMP2-t kifejező, mind a Fluo-4-gyel töltött parentális pluripotens őssejtekben. A differenciálatlan hES-GCaMP2 sejtekben a különböző ligandumok, ATP, LPA, tripszin vagy angiotenzin II által indukált kalcium jelek hasonlóak voltak a Fluo-4-tel töltött sejtekben tapasztaltakhoz (27.A ábra). Az intracelluláris kalciumszint változások pedig szignifikánsnak bizonyultak az összes indukáló ágens (ATP, tripszin, LPA, angiotenzin II) esetében (27.B ábra). A korábbi eredményeknek megfelelően sem a trombin, sem a hisztamin, sem a GABA nem váltott ki kalcium jelet. Ezekben a kísérletekben az átlagos jelszinteket mértük egymástól független hESC-csomókban, és a Fluo-4 töltött sejtenyészetekben az adatfeldolgozás során kizártuk a környező dajkasejtek (MEF) kalciumszint-változásait (27.C ábra). A hESC csomókban a kalcium jelek alapvetően hasonlóan alakultak mindkét alkalmazott fluoreszcens kalcium indikátor (GCaMP2 vagy Fluo-4) esetében, a jelek intenzitásában és dinamikájában azonban nyilvánvaló különbségek mutatkoztak, feltehetően az indikátorok eltérő dinamikus tartománya miatt (27.A és B ábra). A kalcium jelek sejtszintű változásainak és az indikátorok sejten belüli eloszlásának vizsgálatára nagyobb nagyításokat alkalmaztunk (lásd 28. ábra). Az élő sejtek magjait Hoechst 33344 (Hst) festékkel jelöltük és a GCaMP2 vagy Fluo-4 fluoreszcenciájának változásait párhuzamosan rögzítettük ugyanazokban a sejtekben (28.A és B ábra, alsó panelek).



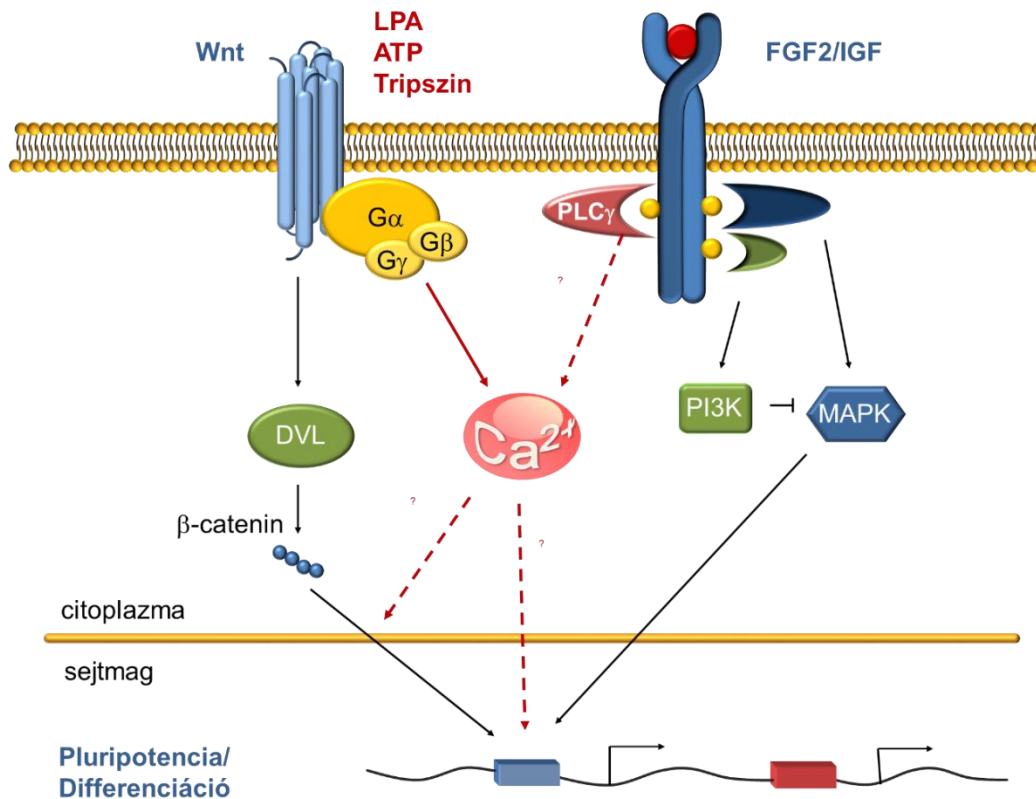
27. ábra: Kalcium jelek összehasonlítása szülői és GCaMP2-t kifejező pluripotens HUES9 sejtsomókban. (A) A kalciumjeleket HUES9-GCaMP2 (fekete vonal) sejtekben vagy Fluo-4-AM-mel töltött HUES9 sejtekben (szürke vonal), pluripotens körülmények között, egér dajkasejteken növesztve, konfokális mikroszkóppal mértük. Az ATP (100 μ M), alacsony koncentrációjú tripszin (2,5 μ g/ml) és ionomicin (5 μ M) hozzáadását a megfelelő nyilak jelzik. A kalcium-függő intracelluláris fluoreszcencia maximális és minimális szintjét ionomicin jelenlétében, illetve feleslegben lévő EGTA hozzáadása után határoztuk meg. A fluoreszcencia adatokat az intracelluláris kalciumszintek kalibrált tartományára ($F_{max}-F_{min}$) normalizáltuk. A görbék három független kísérletben mért 30 sejt átlagát (\pm SD) mutatják. (B) Különbféle indukáló szerek hatása a Fluo-4 és a GCaMP2 indikátorok segítségével meghatározva. A relatív fluoreszcens intenzitást az intracelluláris kalciumszintek kalibrált tartományára ($F_{max}-F_{min}$) normalizálva adtuk meg. Az értékek az átlagot \pm S.E.M. mutatják 5 független kísérletből. A szignifikancia szinteket Student T-próbával számítottuk ki; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$. (C) Konfokális mikroszkópos felvételek a HUES9-GCaMP2 (felső panel) és a Fluo-4-gyel töltött HUES9 sejt (alsó panel) sejtsomókról. Az elemzésbe bevont területek sárga vonalakkal vannak jelölve. Az egér dajkasejteket (MEF) kizártuk az elemzésből a Fluo-4-tel töltött minta esetében (alsó panel).



28. ábra A kalciumjel eloszlása a sejtmagok és a citoplazma között HUES9-GCaMP2 (A) és Fluo-4-tel töltött HUES9 (B) sejtekben. A kalcium jeleket pluripotens körülmények között növesztett sejteken mértük. A sejtmagokat Hoechst33342-vel (piros) jelöltük meg. A konfokális felvételek elemzésekor a sejtmagok (sárga körökkel jelölve) és a citoplazma (piros körökkel jelölt) területén mért intenzitásokat vettük figyelembe (A és B. panelek alsó részei). A kalcium jel indukáló szerek hozzáadását nyilak jelzik. Az ATP és az ezt követő tripszin és ionomicin hozzáadását követő kalciumjelek a citoplazmában (fekete vonal) és a sejtmag területén (szürke vonal). A fluoreszcencia intenzitást a jelzett kezelések utáni maximális értékek meghatározásával számítottuk ki. Az értékek az átlagot \pm S.D. 3 független mérésből. A szignifikancia szinteket a Student T-próbával számítottuk ki; *: $p < 0,05$, **: $p < 0,01$, ***: $p < 0,001$.

Amint az a 28. ábrán látható a GCaMP2-t kifejező HUES9 sejtek esetében a kalciumfüggő fluoreszcencia változások a citoplazmatikus régiókban lényegesen nagyobbak voltak, mint a magi területeken (28.A ábra, felső és középső panelek). Ezzel szemben a Fluo-4-el töltött HUES9 sejtekben pontosan ellentétes tendenciát tapasztaltunk: a kalciumkoncentráció változásaira adott fluoreszcencia válaszok sokkal nagyobbak voltak a sejtmagban, mint a citoplazmatikus régiókban (28.B ábra, felső és középső panelek). Ugyanakkor a kalcium jel mindkét kompartmentben és mindkét indikátor esetében hasonló intenzitású és lefutású volt.

A humán pluripotens őssejtek kalcium szignalizációjának feltárásban tett úttörő vizsgálataink megalapozták a mérés technikai alapokat, feltárták a hPS sejteken működő Ca^{2+} mobilizáló mechanizmusok egy részét, amelyeket későbbi kutatások is megerősítettek [181-187]. Azt, hogy a Ca^{2+} -függő jelátviteli útvonalak hogyan szabályozzák az őssejtek önmegújulását és pluripotenciáját egy összefoglaló cikkben [188] tárgyaltuk és a 29. ábrán foglalam össze.

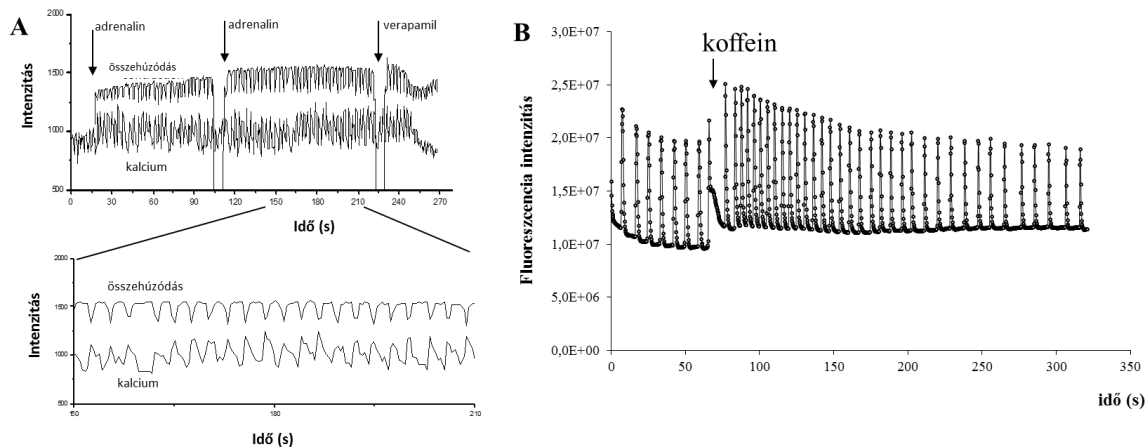


29. ábra A humán pluripotens őssejtekben kulcsfontosságú szabályozási útvonalak, amelyek kapcsolhatók a kalcium jelátvitellel.

Amíg a pluripotens őssejtek kalcium jelátviteléről csak korlátozottan álltak rendelkezésre adatok, addig a hPSC-eredetű, differenciált sejt típusok (különösen a neuronok [174] és a kardiomiociták [189]) felhasználásával nagy számban végeztek kalcium jelátviteli vizsgálatokat [190].

Vizsgálataink idején a szívizom irányú differenciáció vizsgálata elsősorban az EB alapú spontán differenciációkor keletkező szívizomsejtek szelekcióján alapult. Mechanikusan kiemelt dobogó szívizomtelepeken nekünk is sikerült megmutatnunk, hogy az összehúzódás és a citoplazmatikus kalcium szint összehangoltan működik, illetve az adrenalin indukáló és a verapamil gátló hatását is sikerült demonstrálnunk (30.A ábra). A hES-GCaMP2 sejtekből differenciált szívizom telepeket a spontán kontrakciók és Ca^{2+}

oszcillációk alapján lehetett felismerni, így nem feltétlenül volt szükség a dobogó terület mechanikus kiemelésére. Az ilyen, konfokális kamrában differenciálódó szívizomtelepen mértük a koffein hatását a Ca²⁺ tranziensekre (30.B ábra).



30. ábra Kalcium jelek mérése humán ESC-eredetű kardiomiocitákban – az adrenalin, a verapamil és a koffein hatása. (A) A kalcium jeleket Fluo-4-tel töltött hESC eredetű kardiomiocitákban mértük, konfokális mikroszkóp segítségével. Az adrenalin (10 µg/ml) és a verapamil (1,5 µM) hozzáadásának idejét a megfelelő nyilak jelzik. A grafikonon a szívizomsejtek [Ca²⁺]_i és sejtmozgásának időbeli lefutását ábrázoltuk (a fluoreszcens és az áteső felvételek adatait elemeztük). A sejtösszehúzódás és a kalcium-függő fluoreszcencia intenzitás párhuzamos elemzése azt mutatta, hogy az adrenalin hozzáadása után az összehúzódások és a kalcium jelcsúcsok nagysága is gyorsan megemelkedik. A verapamil adása az intracelluláris kalcium szint csökkenéséhez és a spontán összehúzódások leállításához vezetett. (B) A koffein hatását HUES9-GCaMP2 eredetű kardiomiocitákban mértük. A fluoreszcencia adatok elemzése a koffein hozzáadása (ezt a nyíl jelzi) után a kalcium tranziensek megnövekedett amplitúdóját és gyakoriságát mutatja. A koffein hatása átmenetinek bizonyult, és a kalcium jelek három perc elteltével visszatértek az alap intenzitásra és frekvenciára.

A pluripotens őssejtből származó szívizomsejteken végzett vizsgálataink további bizonyítékul szolgáltak ahhoz, hogy ezek a szívizomsejtek fiziológiai tulajdonságaikat tekintve közel állnak a humán szívizomsejtekhez. A szívizom irányú differenciációs protokollok hatékonyabbá válásával [191-193] a nagy átérésztőképességű rendszerek használata és a klinikai minőségű szívizomsejtek előállítása is lehetővé vált. A gyógyszergyártók növekvő érdeklődése ezen sejtek gyógyszer-hatékonysági és toxikológiai vizsgálatokhoz való felhasználása iránt arra utal, hogy ezek a humanizált platformok növelhetik a hatékonyság előrejelzését és csökkenthetik a gyógyszerfejlesztési költségeket, ezentúl alternatívát jelentenek az állati eredetű sejtekkel szemben [194, 195].

Mi a szívizommal kapcsolatos kutatásinkat a szívprogenitor sejtek vizsgálatára [123], a jelenleg szívizom modellként használt sejtvonalak transzkriptomikai és fenotipikus összehasonlítására [196] és egy kalcium indikátort kifejező, patkánymodell [2] fejlesztésére használtuk fel.

A humán pluripotens őssejtvonalak felfedezését követően, a szívizom mellett a különböző neurális sejttypusok kutatása is új lendületet kapott. Mivel az idegsejtek működésében a kalcium számos életfontosságú folyamatot szabályoz, mint az ingerület átvitel, az excitotoxicitás, a szinaptikus jelátvitel, a génexpresszió és a sejthalál [197], már a kezdetektől viszonylag sok adat állt rendelkezésre a humán pluripotens őssejtekből nyerhető neurális sejtek jellemzésére [99]. Első munkáinkban [99, 121] a spontán differenciálódó őssejtkultúrából mechanikusan eltávolított neurális progenitor populációk (ún. rozetták) további differenciáltatásával nyert neurális sejteken vizsgáltuk a kalcium jeleket, a kalciumérzékeny festék Fluo-4, illetve a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérje GCaMP2 segítségével. A kísérletek során azt tapasztaltuk, hogy mindkét módszerrel mérhető a ligandum aktiválta kalcium jelek, de a Fluo-4 igen toxikusnak bizonyult (főleg hosszabb idejű mérésekkor), míg a GCaMP2 a spontán kalcium gradiensek követésére nem volt elég gyors dinamikájú. Ezenkívül, a spontán differenciációval létrehozott neurális kultúrák elég változatos morfológiát mutattak és a mérések ismétlésekor kapott eredmények is nagyon szórtak.

4.3.3. Kalcium szignalizáció vizsgálata genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével hPSC –eredetű idegsejtekben

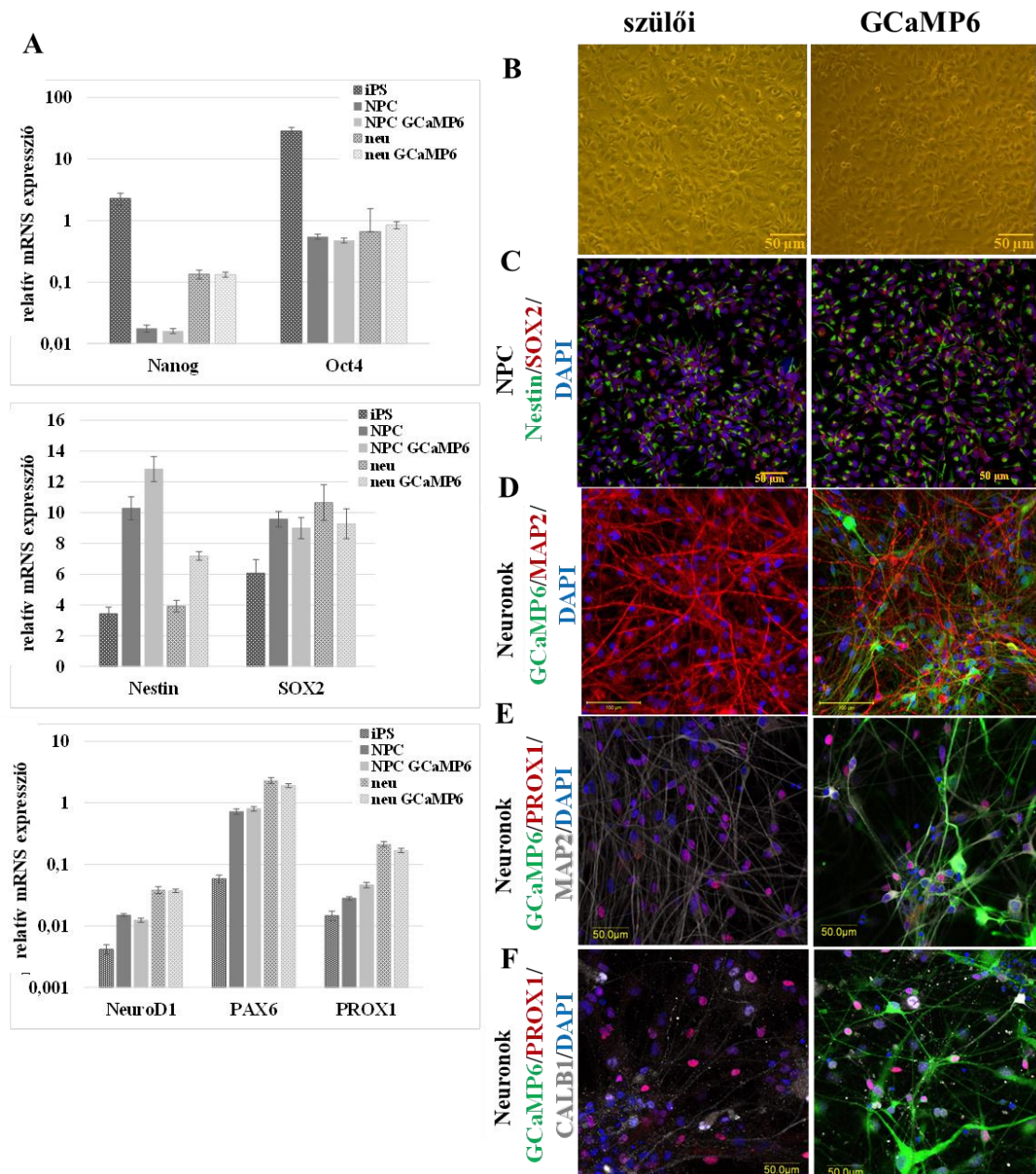
(vonatkozó fontosabb közlemény: Vőfély et al. Mol Cell Neurosci. 2018)

A fent említett problémákra két metodikai fejlesztéssel találtunk megoldást; egyrészt irányított differenciációt használtunk, hogy a differenciált tenyészetek heterogenitását csökkentjük és a reprodukálhatóságot növeljük. Másrészt, hogy a kalcium jelátvitelt festékfeltöltés nélkül tudjuk vizsgálni, stabilan expresszáltunk, egy idegsejtek kalcium jeleinek mérésére tovább fejlesztett kalciumindikátor fehérjét (GCaMP6fast) az NPC-kben a SB transzpozon rendszerrel.

Egy akkoriban közölt protokoll alapján (és Dr. Réthelyi János segítségével) hippokampális neurális progenitor (NPC) tenyészeteket hoztunk létre humán iPSC-kből, majd ezeket tovább differenciáltattuk hippokampális szemcsesejtekké (DG neuronokká) [119]. Azért választottuk ezt a sejttypust, mert a hippokampális sejtek vizsgálata nagyon érdekes több szempontból is; az idegrendszeri betegségek őssejt-alapú terápiájakor progenitor sejteket használnak [67], a hippokampuszban felnőtt korban is neurogenesis folyik [198], illetve a

hippokampusz működési zavarait több betegségben is kimutatták [199]. Így a hippokampális sejtek érésének vizsgálata hozzásegíthet a hippokampusz működésének és működési zavarainak megértéséhez, ami a betegségek gyógyításában nagy segítséget nyújthat.

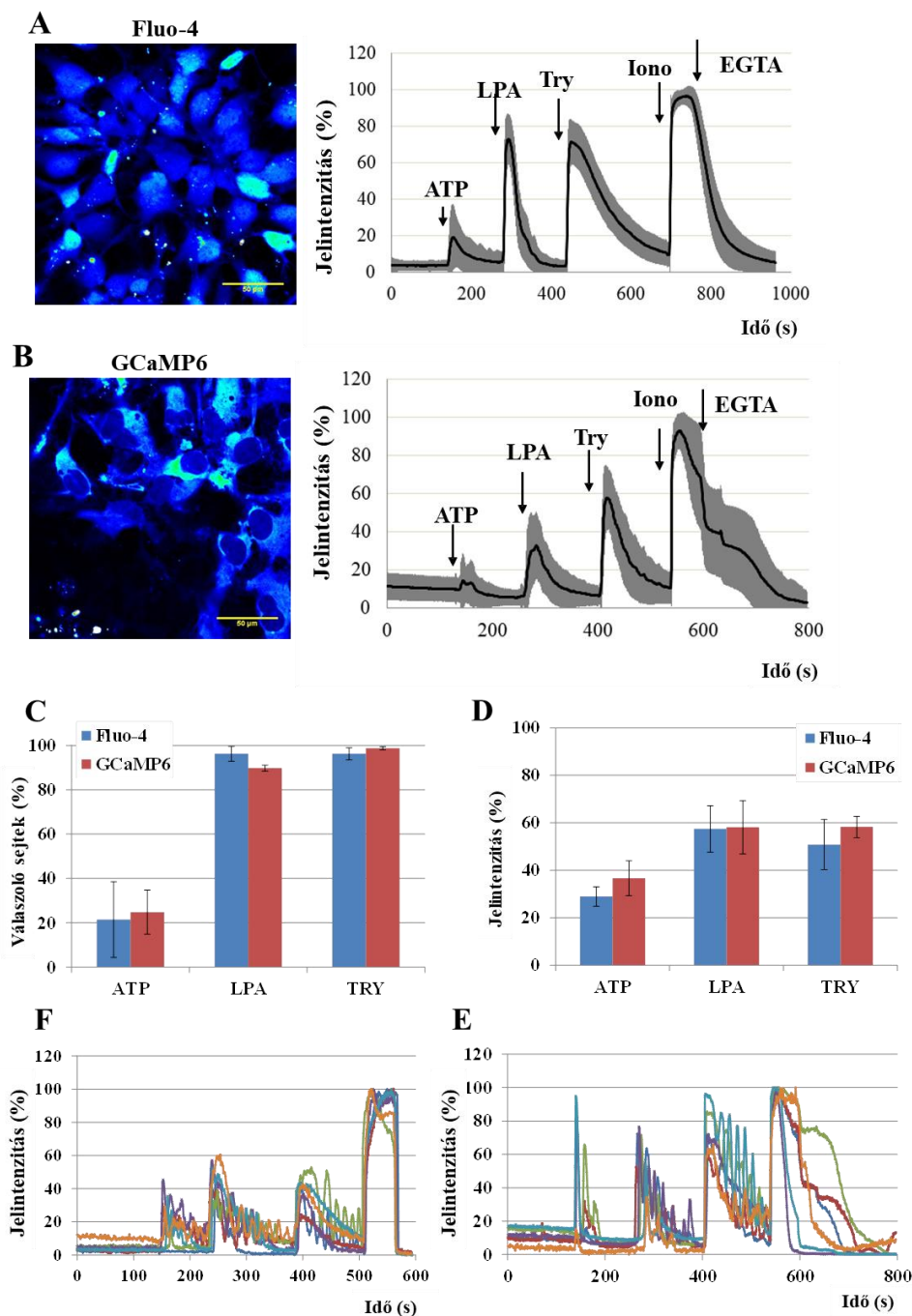
A stabil GCaMP6f expressziót az NPC állapotú sejtekbe egy CAG-GCaMP6fast-CAG-puromycin kazetta bevitelével valósítottuk meg. A GCaMP6f kifejeződése nem volt hatással sem az NPC-k génexpressziós mintázatára, sem a morfológiájára, sem pedig az idegi differenciálódási képességre (31. ábra).



31. ábra Szülői és GCaMP6f-ot kifejező neurális progenitorok (NPC) és neuronok (neu) jellemzése. (A) A grafikon az iPSC, a szülői és a GCaMP6f-ot expresszáló NPC-k és a 4 hetes differenciálódó neuronok mRNS-expressziós profilját mutatja. A különböző differenciációs állapotra jellemző markergének expressziós szintjét az RPLP0 háztartási génhez viszonyítottuk. Az Oct4 és a Nanog a

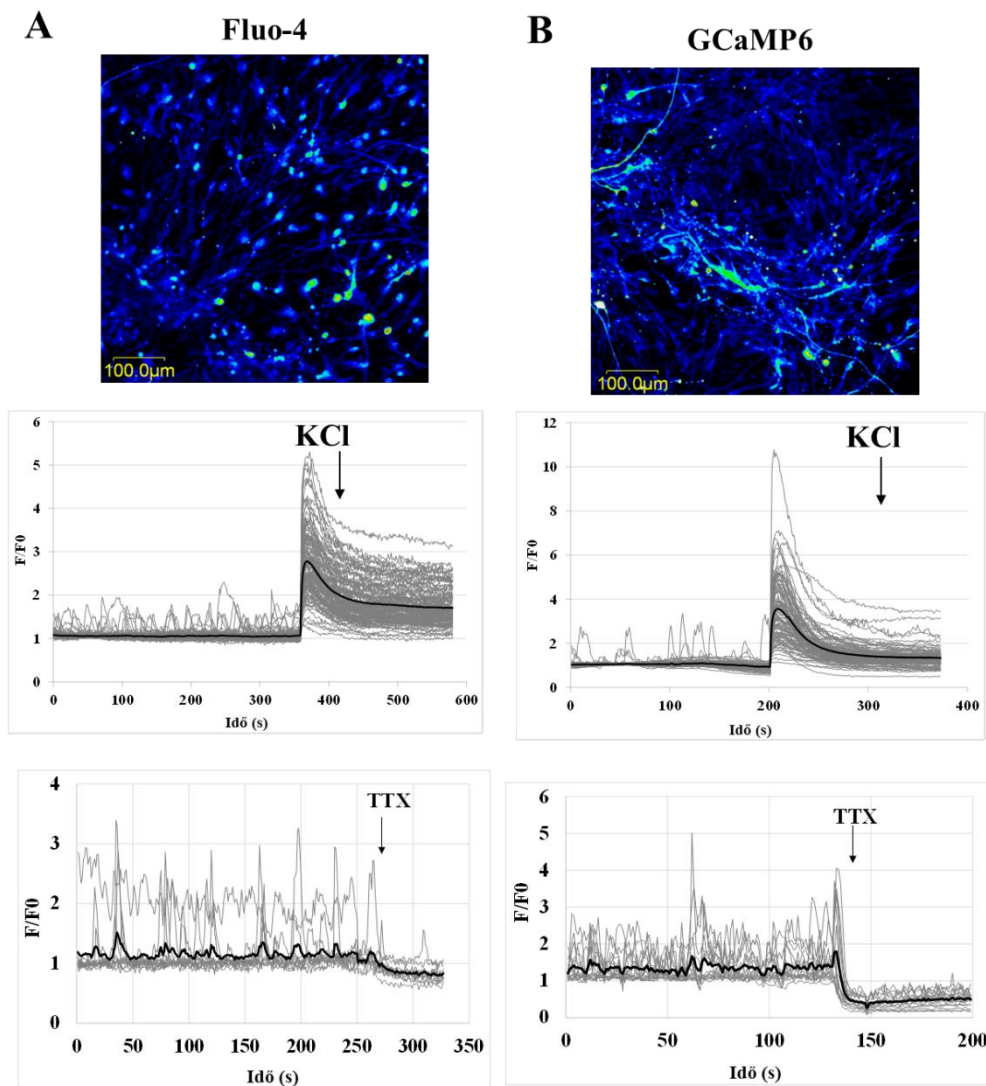
pluripotens, a Sox2 és a Nestin a progenitor, míg a NeuroD1, a PAX6 és a PROX1 a neuronok markerei. (B-F) Az NPC-k (B-C) és a differenciált neuronok (D-F) vizsgálata immuncitokémiával. A mintákat a sejttípusoknak megfelelő specifikus fehérjéket felismerő antitestekkel festettük; Nestin (zöld) és SOX2 (piros) az NPC-k esetében, MAP2 (piros vagy szürke), CALBINDIN (szürke) és PROX1 (piros) a neurális sejttípusokhoz. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük.

A GCaMP6f-ot expresszáló illetve a Fluo-4 kalciumindikátor festékekkel töltött NPC-k funkcionális tulajdonságainak összehasonlítása érdekében a kalcium jeleket részletesen jellemeztük. Azt találtuk, hogy az ATP, LPA vagy tripszin által indukált kalcium jelek hasonlóak mindkét módszer esetében, mind a válaszoló sejtek számát, mind a jelek nagyságát és lefutását tekintve (32. ábra).



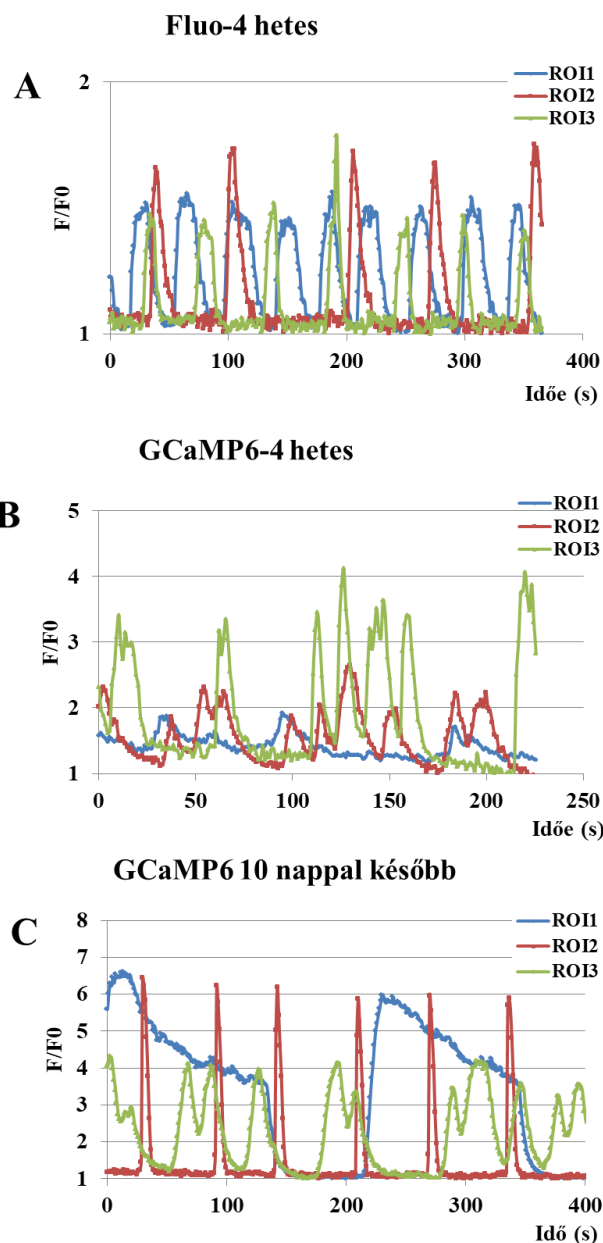
32. ábra A szülői és a GCaMP6-ot expresszáló NPC-k kalciumjeleinek összehasonlítása.(A-B) Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek és kalcium mérések Fluo-4-el töltött NPC-k (A) vagy GCaMP6-ot expresszáló NPC-k (B) esetében. A grafikonon a szignálintenzitás átlagértékeket \pm SD mutatjuk be (A: n=200, B: n=129). A kalciumjeleket ATP (100 μ M), LPA (10 μ M), alacsony koncentrációjú tripszin (2,5 μ g/ml) és ionomycin (5 μ M) hozzáadásával mértük - a szerek hozzáadását a megfelelő nyilak mutatják. A kalcium-függő fluoreszcencia maximális és minimális szintjét ionomycin jelenlétében, illetve feleslegben lévő EGTA hozzáadása után határoztuk meg, és a celluláris kalciumszinteket erre a kalibrált tartományára ($F_{max}-F_{min}$) normalizáltuk. (C-D) Különböző indukálószer hatása a reagáló sejtek számára (C) és a kalciumjel intenzitására (D) a Fluo-4-tel töltött és a GCaMP6-ot expresszáló NPC-k esetében. A reagáló sejtek számát úgy számítottuk ki, hogy meghatároztuk azon sejtek számát, amelyek több mint 10%-os emelkedést mutattak az alap kalciumszinthez képest. A relatív fluoreszcens intenzitást a kezelések utáni maximális értékek meghatározásával számítottuk ki, a celluláris kalciumszintek kalibrált tartományára ($F_{max}-F_{min}$) normalizáltuk, az A panelen leírtak szerint. Az értékek 3 független kísérlet (Fluo-4: n1=265, n2=200, n3=181, GCaMP6: n1=82, n2=77, n3=129) szignálintenzitás átlagértékeit \pm SD mutatják. Egyik esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a Fluo-4-tel töltött és a GCaMP6-ot expresszáló sejtek között (kétmintás t-teszt, $p>0,05$). (E-F) A grafikonok olyan egyedi sejtek reprezentatív kalcium jeleit mutatják, amelyek kalcium-oszcillációt mutatnak ATP, LPA és tripszin hozzáadása után a Fluo-4 töltött (E) és GCaMP6-ot expresszáló (F) NPC sejtek esetében.

Ezt követően a hippokampális NPC-kből PROX1-et expresszáló DG neuronokat differenciáltattunk és a 4-5 hetes differenciálódó kultúrákon vizsgáltuk a kalcium jeleket, amint az a 33. A és B ábrákon látható. Azt találtuk, hogy a differenciált DG neuronok teljes mértékben (gyakorlatilag 100%-ban) kifejezett kalcium jellel reagálnak a KCl okozta membránpotenciál változásra és spontán aktivitást is mutattak, ami a differenciálódás során kialakult összetett neuronhálózatot jól érzékelteti. Az egyes idegsejtekben megfigyelt gyors, részlegesen kapcsolt, spontán kalcium tranzienseket 100 μ M tetrodotoxin (TTX - egy feszültségfüggő nátriumcsatorna-blokkoló) teljesen megszüntette, mind a GCaMP6-ot expresszáló, mind a Fluo-4 töltött neuronokban. A TTX-el szembeni érzékenység azt mutatja, hogy ezekben az idegsejtekben a spontán kalcium aktivitás akcióspotenciál függő. A GCaMP6-ot expresszáló neuronokban magasabb fluoreszcencia jelintenzitást figyeltük meg Fluo-4-tel töltött társaikhoz képest, azonban ez a különbség nem bizonyult szignifikánsnak.



33. ábra A szülői és a GCaMP6-ot expresszáló neuronok kalciumjeleinek összehasonlítása (a differenciálódás 5 hetében). (A-B) A reprezentatív konfokális mikroszkópos képeket és a kalcium jeleket bemutató grafikonokat a Fluo-4 töltött vagy a GCaMP6-ot expresszáló neuronokban vizsgáltuk, a fekete görbék az átlagértékeket mutatják, míg a szürke görbék az egyedi neuronok válaszait. Az 50 mM KCl (A, $n=110$ / B, $n=109$) vagy 100 μ M TTX (A, $n=13$ / B, $n=17$) hozzáadását a megfelelő nyilak jelzik.

A GCaMP6 expresszió egyik legfontosabb előnye, hogy hosszú távú, folyamatos kalcium-jelátviteli vizsgálatokat lehet végezni ugyanazokkal progenitor és neuron tenyészetekkel, így követhető például a differenciáció előrehaladása. Ezt az egyes idegsejtek spontán kalcium-jeleinek vizsgálatával a 34. ábrán mutatom be.



34. ábra Spontán kalciumtranziensek követése szülői és GCaMP6-ot expresszáló neuronokban. Spontán kalciumtranzienseket mutató egyedi sejtek reprezentatív kalcium jelei (ROI 1-3), Fluo-4 töltött és GCaMP6-ot kifejező neuronokban.

A kalciumindikátor fehérje jelenléte lehetővé tette, hogy az idegsejtek érési folyamatát a kalcium jel változásainak érzékeny, ismételhető detektálása során kövessük.

Összefoglalva, megmutattuk, hogy az *in vitro* differenciáltatott, genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjét (GCaMP6fast) stabilan kifejező humán PSC eredetű hipokampális NPC-k és a neurális tenyészetek alkalmasak a kalcium jelátvitel tanulmányozására. A GCaMP6-ot expresszáló NPC-ken és neuronokon ismételt funkcionális vizsgálatok végezhetők, új és hatékony kísérleti rendszert biztosítva a fejlődésbiológiai, farmakológiai és toxikológiai vizsgálatokhoz. Eredményeinkkel

hozzájárultunk, hogy a hPSC-ből differenciáltatott idegi sejtípusok vizsgálata egyre szélesebb körben elfogadott és használt technika legyen [200-202].

Bár a hPSC-eredetű NPC-k és neuronok alkalmazhatósága a neurogenesis vizsgálatában és a gyógyszerfejlesztésben, valamint az fziológiásan előforduló sejtípusokkal való hasonlósága továbbra is vita tárgyát képezi [203, 204], egyre több adat áll rendelkezésre arról, hogy ezek a modellek sikeresen alkalmazhatók az agy fejlődésének [205] és a különböző betegségek patomechanizmusának [206] megértésében. Bevezetésük a humán toxikológiai vizsgálatokba [207] és alkalmazásuk az őssejt-alapú terápiákban [208] is egyre közelebbi célnak tűnik. Az egyszerű 2D *in vitro* rendszerek, mint amit a fenti cikkünkben bemutattunk, szolgálhatnak első szűrési eszközként, de bizonyos, hogy a megbízhatóbb, reprodukálhatóbb és szélesebb körben érvényes adatok létrehozásához bonyolultabb, többsejtű organotipikus modellekre van szükség. A közelmúltban kifejlesztett háromdimenziós kultúrák (agyi organoidok) és a mikrofluidikai eszközök (chip technológiák) kiválóan alkalmasak az emberi szervek összetettségét modellezni [200, 209, 210].

A fent bemutatott módszereket azóta is sikeresen használjuk. és több betegség hPSC alapú modelljét is vizsgáljuk a segítségükkel, mint például a skizofrénia [127, 211], a DiGeorge szindróma [125, 126] vagy a doxorubicin indukálta szívizom elhalás [170] modellje. Ezen eredmények egy részét közöltük, egy része még megírásra vár, és ebben a dolgozatban részletesebben nem térek ki rájuk. Terveink között szerepel, hogy az organoid technika segítségével a modelljeinket tovább finomítsuk, amihez nagy segítség lesz együttműködésünk Dr. Szabényi Kornéliával (aki PhD dolgozatát a laborunkban végzett munkájából írta és a téma szakértőjévé vált posztdoktori éve alatt).



*Hollerbach Emil grafikája

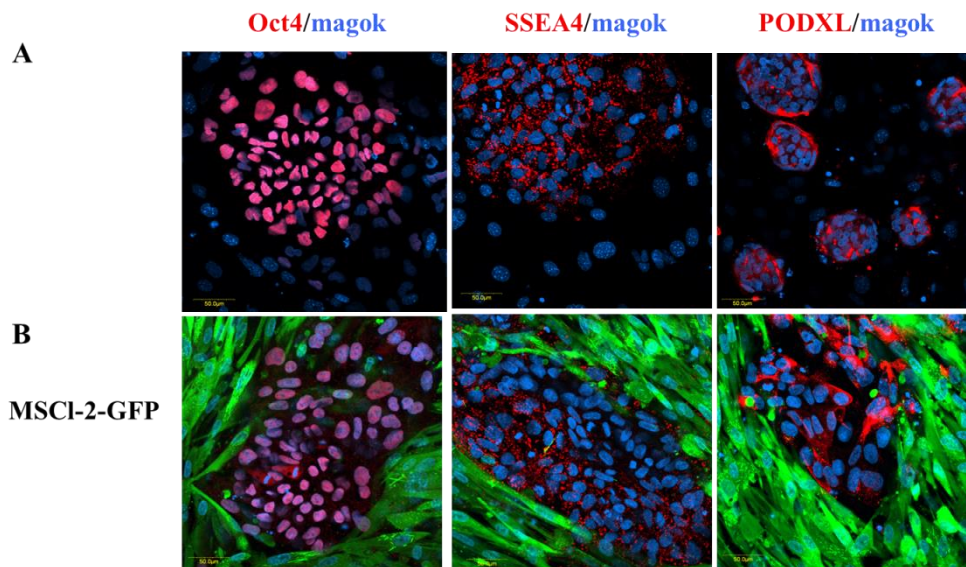
4.4. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek jellemzői és felhasználási lehetőségeik

4.4.1. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek immunológiai tulajdonságai

(vonatkozó fontosabb közlemény: Varga et al. Biochem Biophys Res Commun. 2011.)

A pluripotens őssejtekből elméletben minden testi sejt létrehozható és a laboratóriumunkban mi is többféle differenciációs protokollt honosítottunk, fejlesztettünk és optimalizáltunk (mezenchimális őssejt [117, 118, 212]; szívizomsejt [116, 121, 123, 213], idegsejt [124, 127, 211, 214], endotél sejt [114] és hepatocita [215, 216] irányba). Ezek közül kiemelem, és itt bemutatom azokat a munkákat, amelyekben pluripotens őssejtből multipotens mezenchimális őssejteket hoztunk létre és használtunk betegségmodellezésre. Teszem ezt azért, mert ezt a differenciós protokollt mi fejlesztettük ki és sikeresen használjuk azóta is.

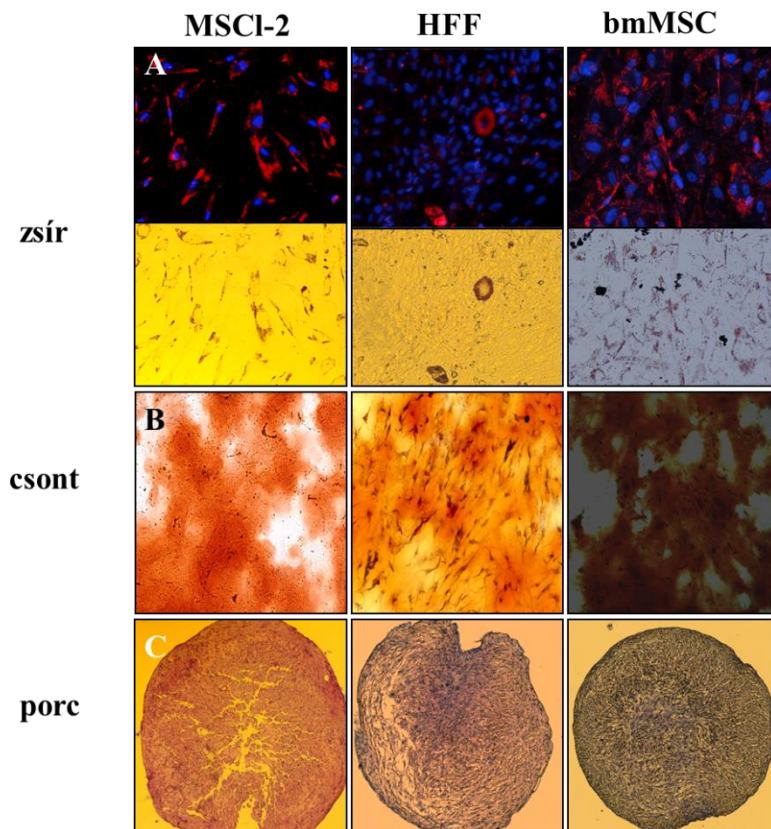
Első célunk egy olyan dajkasejtként használható humán sejtvonallétrehozása volt, amely korlátlanul hozzáférhető és riporter fehérjét is hordoz, hogy az őssejtektől könnyen elkülöníthető legyen. A hES sejtek fenntartására többféle olyan dajkasejt típust is használtak, amelyek biztosították az őssejtek pluripotenciájának megőrzését, ugyanakkor korlátaik is voltak. A primer sejtípusok a MEF (egér embrió eredetű) illetve a humán forrásból származók (pl. csontvelői sejtek [217] vagy köldökzsínór eredetű sztrómasejtek [218]) biztosítása korlátozott és az átfertőzés veszélye is jelentős [219]. A humán előbőről készített immortalizált fibroblaszt sejtvonalon való tenyésztés részmegoldást jelentett [220], az autológ dajkasejtek használata pedig még a humán patogének átvitelének kockázatát is kiküszöbölte. Itt azonban jelentős technikai probléma volt az őssejtek és a humán dajkasejtek megkülönböztetése/elválasztása. Ezért HUES9 őssejtekből olyan sejteket (MSCI) differenciáltattunk, amelyek dajkasejtként használhatóak a kiindulási HUES9 sejtek tenyésztésére. A differenciációs protokoll nagyon egyszerű volt, a spontán differenciáció során létrejött fibroblaszt-szerű sejteket limitált tripszinezéssel és néhány átültetéssel homogéné lehet tenni. Az így létrehozott MSCI sejtekből harmadik generációs lentivírus segítségével eGFP-t stabilan kifejező sejteket hoztunk létre, amelyeket jól el lehetett különíteni az őssejtektől, mind mikroszkópiás, mind flow citometriás vizsgálatokban. Először ellenőriztük, hogy az eGFP-MSCI sejtek a MEF-hez hasonlóan támogatják-e a hES sejtek növekedését és pluripotens állapotát (35. ábra A és B).



35. ábra: Különböző dajkasejteken tenyésztett HUES9 sejtek pluripotencia markerei A HUES9 sejteket mitomicin kezelt MEF (A) vagy MSCI-2-GFP (B) feeder sejteken tenyésztettük két napig nyolclyukú konfokális kamrában majd fixáltuk és festettük a következő pluripotencia markerekre: Oct4, SSEA4, PODXL (piros). A differenciálatlan sejtmarkerekre specifikus antitestek csak a HUES9 csomókat festették meg, míg a MEF vagy MSCI-2-GFP sejtek nem mutattak festődést ezekkel a markerekkel. A sejtmagokat DAPI-val (kék) festettük.

A létrehozott MSC1 klónok közül a „2” számú bizonyult a legsikeresebbnek (MSC1-2). Előnyös növekedési tulajdonságai (passzázs 30-ig nem mutatta a szenescencia jeleit) és stabil morfológiája miatt ezt a vonalat kezdtük el részletesebben vizsgálni. Morfológiája alapján arra gyanakodtunk, hogy nem „egyszerű” fibroblaszttal van dolgunk, hanem mezenchimális őssejttel. Ezért ellenőriztük, hogy megfelel-e a „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” [53] által szabott kritériumoknak.

Először azt teszteltük, hogy az MSC1-2 sejtek differenciálhatók-e a kanonikus mezodermális (osteoblaszt, kondrogén, adipogén) irányok felé. Kontrollként egy kereskedelembe kapható humán fibroblaszt sejtvonalat (HFF-1), valamint humán csontvelőből izolált MSC-eket használtunk (bmMSC). Azt találtuk, hogy a HUES9 sejtekből előállított MSC1-2 sejtek, hasonlóan a bmMSC-khez, megőrizték kanonikus differenciálódási potenciáljukat, míg a HFF-1 sejtek zsír és csont irányba igen csökkent differenciálódási képességet mutattak (36. ábra).



36. ábra MSC1-2, HFF-1 és bmMSC sejtek differenciálódása (A) Az adipogén differenciálódást az Oil Red O-val pirosra festett intracelluláris lipidcseppek (piros) mutatják. A sejtmagok DAPI-val (kék) jelöltek. (B) Az MSC-k oszteogén differenciálódását az Alizarin Red-del vörösre festett kalcium-hidroxiapatit-pozitív területek kialakulása mutatja. (C) A sejtek nagy sűrűségű tenyészetekben a kondrogén fenotípus kialakulását mutatták; a toluidin késsel festett tenyészeteken a rózsaszín extracelluláris mátrix festődés jelzi a proteoglikánokat. Nagyítás: 200x.

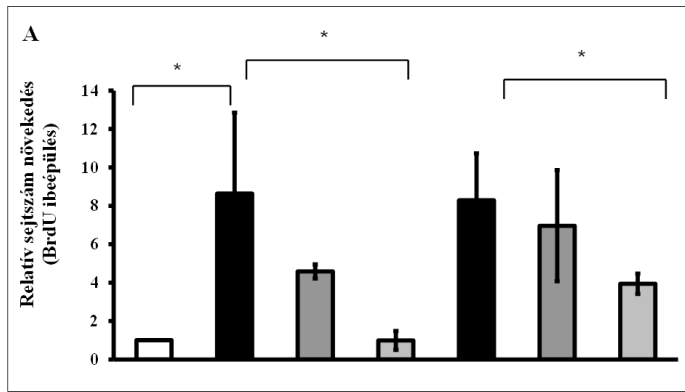
Ezután a sejtfelszíni markerek expresszióját hasonlítottuk össze bmMSC, HFF-1 és MSC1-2 sejtekben, áramlási citometriás analízissel. Amint azt az 4. táblázat dokumentálja, mindhárom sejtípus egyenletesen magas expressziót mutatott az összes jól ismert MSC-markerre (CD44, CD73, CD90 és CD105). Fontos, hogy a hemopoietikus markerek (CD14, CD34, CD45, CD117, CD133 vagy HLA-R) viszont nem mutattak mérhető kifejeződést. A HFF-1 sejtekre jellemző volt a CD14 magas sejtfelszíni expressziója, amely bmMSC vagy MSC1 sejtekben nem volt kimutatható.

4. táblázat: MSC felszíni markerek kifejeződése

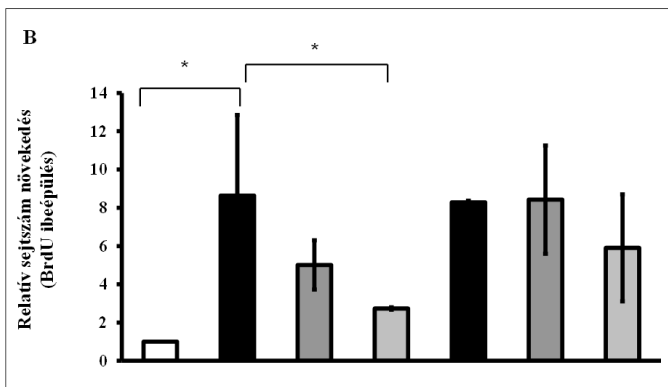
	MSC1-2	HFF-1	bmMSC
CD44/H-CAM	96,97±2,81	93,23 ± 9,44	89,69 ±10,04
CD105/Endoglin	89,61 ± 3,95	95,73 ±6,19	86,08 ±8,85
CD73	99,51 ± 0,25	99,21 ± 0,22	93,57 ±6,44
CD90/Thy-1	96,24 ± 2,41	87,38 ±7,87	89,78 ±7,67
CD34	0,00	1,24 ± 2,49	0,00
CD14	1,04 ± 1,88	85,27 ± 10,47	0,09 ±0,19
CD45	0,00	0,00	0,00
CD117/c-kit	0,00	0,00	0,00
CD133	0,00	0,00	0,00
HLA-DR	0,00	0,00	0,00

Humán embrionális őssejt-eredetű MSC1-2 sejteket, HFF-1 fibroblasztokat és bmMSC-eket fluoreszcens festékekhez konjugált specifikus monoklonális antitestekkel festettünk. A táblázatban a megfelelő izotípussal kapuzott pozitív sejtek arányát tüntettük fel, 4 független kísérlet átlaga±SD látható.

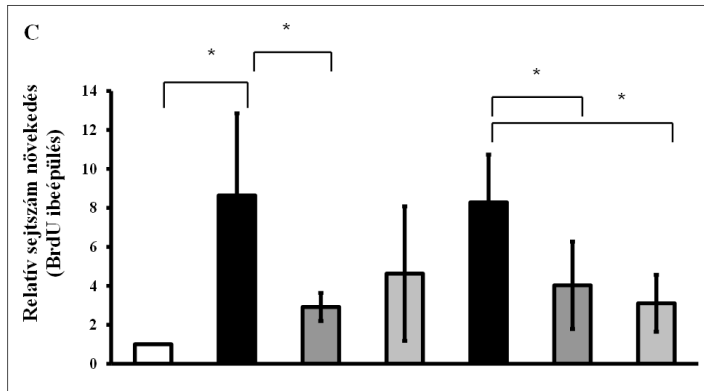
Az MSC-k terápiásán is jelentős tulajdonsága, hogy immunszuppresszívek, mind *in vitro*, mind *in vivo* gátolják az immunválaszokat [221, 222]. Hogy ezt teszteljük, mitogén által kiváltott T-sejt proliferációt vizsgáltunk az MSC1-2, HFF-1 és bmMSC sejtek immunszuppresszív tulajdonságainak összehasonlítására. Egészséges donorok humán PBMC-jét aktiváltuk ConcalinA (ConA) vagy fitohemagglutinin (PHA) mitogén aktivátorokkal, és azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolják a mezenchimális sejtek az aktivált sejtek proliferációját (ezt a vizsgálatot a Debreceni Egyetemen Dr. Rajnavölgyi Éva csoportjával együttműködésben végeztük).



PBMC	+	+	+	+	+	+	+
ConA aktiváció	-	+	+	+	-	-	-
PHA aktiváció	-	-	-	-	+	+	+
MSCI-2	-	-	+	+	-	+	+
			10 ³	10 ⁴		10 ³	10 ⁴



PBMC	+	+	+	+	+	+	+
ConA aktiváció	-	+	+	+	-	-	-
PHA aktiváció	-	-	-	-	+	+	+
HFF-1	-	-	+	+	-	+	+
			10 ³	10 ⁴		10 ³	10 ⁴



PBMC	+	+	+	+	+	+	+
ConA aktiváció	-	+	+	+	-	-	-
PHA aktiváció	-	-	-	-	+	+	+
bmMSC	-	-	+	+	-	+	+
			10 ³	10 ⁴		10 ³	10 ⁴

37. ábra: MSCI-2, HFF-1 és bmMSC sejtek hatása a mitogén limfocita stimulációra A PBMC-k mitogén stimulációját a jelzett számú HUES9-eredetű MSCI-2 (A), HFF-1 fibroblaszt (B) vagy humán felnőtt bmMSC (C) jelenlétében mértük. A limfociták aktiválását ConA vagy PHA indukálta, és az aktivált sejteket együtt tenyésztettük az adott számú MSC-vel. A grafikonon a sejtproliferáció relatív növekedésének 4 független kísérletben mért átlag±SD-értékét mutatjuk be.

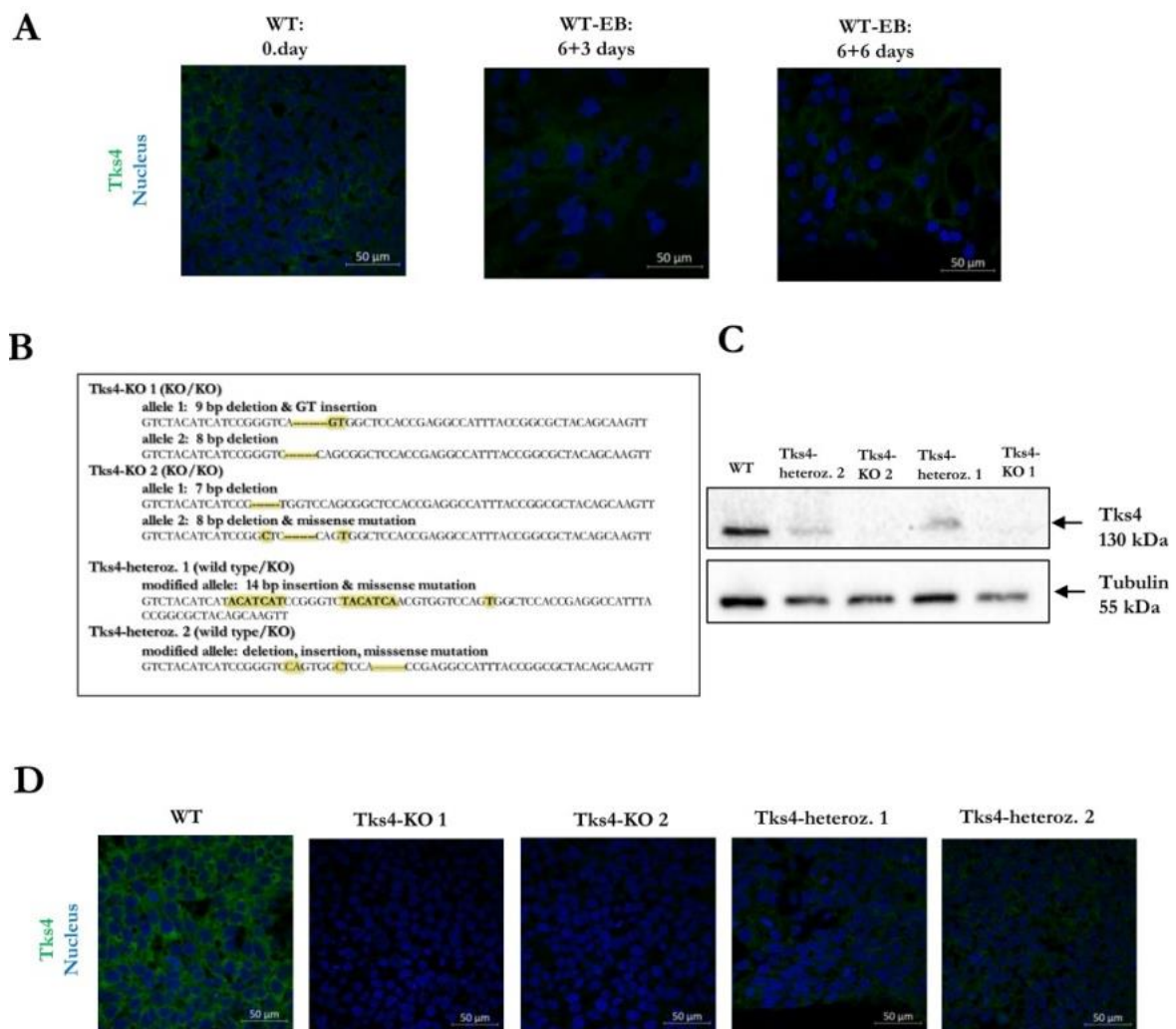
A 37.A ábrán látható, hogy az MSC12-ek jelenléte dóziszfüggő módon elnyomta a limfociták mitogén válaszát. 10^3 és 10^4 MSC1-2 sejt hozzáadása az 1×10^6 PBMC-hez hatékonyan csökkentette a ConA által kiváltott proliferációt, míg a PHA által indukált limfocita proliferáció csak 10^4 MSC1-2 sejt jelenlétében volt szignifikáns. Hasonló hatást lehetett kimutatni, ha bmMSC-eket használtunk (37.C ábra). A HFF-1 sejtek is gátolták a limfociták proliferációját de csak ha ConA-t használtunk a stimulációhoz (37.B ábra). Így a korábbi irodalmi adatokkal összhangban azt találtuk, hogy a HUES9-eredetű MSC1-2 és a felnött bmMSC-sejtek fenotípusos hasonlóságot mutatnak.

A korábbi tanulmányokban különböző protokollokat alkalmaztak az MSC-k hESC-ből való előállítására; beleértve az egér OP9 sejtekkel való együttes tenyésztést [223], az egysejtrétegű [224] és háromdimenziós (embriótest) spontán differenciálódást [225], illetve a Rock inhibitor [226] vagy a HOXB4 gén overexpresszió [227] alkalmazását. Mi egy új, egyszerűsített módszert dolgoztunk ki fenotípusosan és funkcionálisan is homogén, hESC-eredetű MSC populációk előállítására. Differenciációs protokollunk nem kívánt sem xenogén táplálósejteket, sem szelekciót (manuális vagy FACS), sem pedig kémiai vagy biológiai induktorok használatát. Ezek az MSC1-2 sejtek hosszú távon (30 passzázsig) fenotípusos vagy funkcionális változások nélkül szaporíthatók és fenntarthatók *in vitro* tenyészetben. A HUES9-eredetű MSC1-2 további immunológiai jellemzését Rajnavölgyi Éva (Debreceni Egyetem) csoportjával végeztük. Itt az MSC1 sejtek dendritikus sejtek (DC) fenotípusára és funkcióira gyakorolt hatását vizsgáltuk [212, 228], hogy jobban megérthessük az immunszupresszió mechanizmusát. Az autológ dajkasejtek alkalmazása a különböző extracelluláris mátrixok megjelenésével erősen háttérbe szorult. A mezenchimális ősz/stromasejtek terápiás felhasználása annál inkább előtérbe került az elmúlt évtizedben; a különböző fertőző betegségek visszaszorítására terápiás készítmények jelentek meg [229], és klinikai kipróbálások sora indult [230-232] nemcsak ezekkel a különleges sejtekkel, de a belőlük kinyerhető extracelluláris vezikulákkal is [233]. Habár MSC-k kinyerhetők különböző szövetekből, ez mindig donorfüggő marad, és a technológiák fejlődésével a pluripotens őssejt eredetű MSC-k egyre nagyobb teret kaphatnak. Nem csupán mert „korlátlan” forrást jelentenek, hanem a hatékonyságot és biztonságot növelő genetikai módosítások is könnyen elvégezhetők rajtuk [234]. Egy most zajló vizsgálatsorozatban az MSC1-2 eredetű exoszómákat vizsgáljuk különböző stresszhatásokat követően (Giricz Zoltán (Simmelweis Egyetem) együttműködésével).

4.4.2. A Frank Ter Haar szindróma humán pluripotens őssejt-alapú modellje

(vonatkozó fontosabb közlemény: László et al. Int J Mol Sci. 2022)

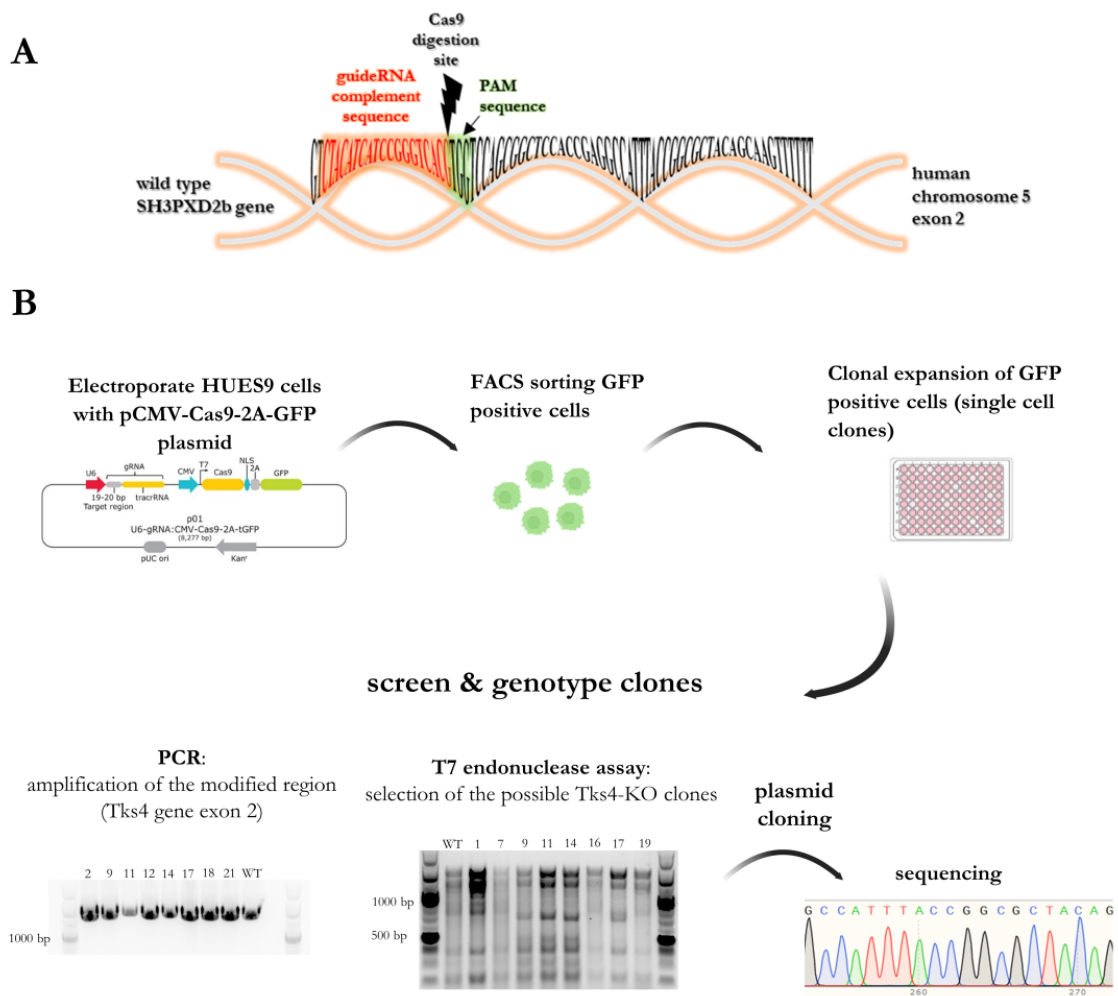
A Frank Ter Haar szindrómában szenvedő betegekben az *SH3PXD2b* gén mindkét alléljában jelenlévő mutációk a TKS4 fehérje elvesztéséhez vezetnek, ami súlyos fejlődési rendellenességet okoz. Mivel a betegség modellezésére humán modell még nem állt rendelkezésre, ezért elhatároztuk, hogy létrehozunk egy humán embrionális őssejt alapú modellt. Első lépésként megvizsgáltuk, hogy a HUES9 sejtvonalba és a belőle spontán differenciációval létrejött tenyészetekben detektálható-e a TKS4 fehérje (38.A ábra). Azt találtuk, hogy mind a pluripotens, mind a differenciált tenyészetekben kimutatható a TKS4 fehérje.



38. ábra: TKS4-knockout HUES9 sejtek létrehozása. (A) A TKS4 fehérje immunfestése pluripotens (0 nap) és spontán differenciálódás során (6+3 és 6+6 nap) HUES9 sejtekben. Reprezentatív konfokális felvételek (B) Az *SH3PXD2b* 2. exonjának szekvenciája két újonnan létrehozott homizigóta mutáns (KO/KO) klónban és két heterozigóta klónban (WT/KO). A mutáns nukleotidokat sárgával jelöltük a szekvenált allélok kérdéses szakaszain. A TKS4 fehérje

elvezetésének bizonyítása a két TKS4-KO HUES9 klónban az eredeti HUES9 és a heterozigóta klónokkal összehasonlítva (C) Western blot és (D) immuncitokémia (ICC) segítségével: TKS4 - zöld, sejtmag - kék (DAPI).

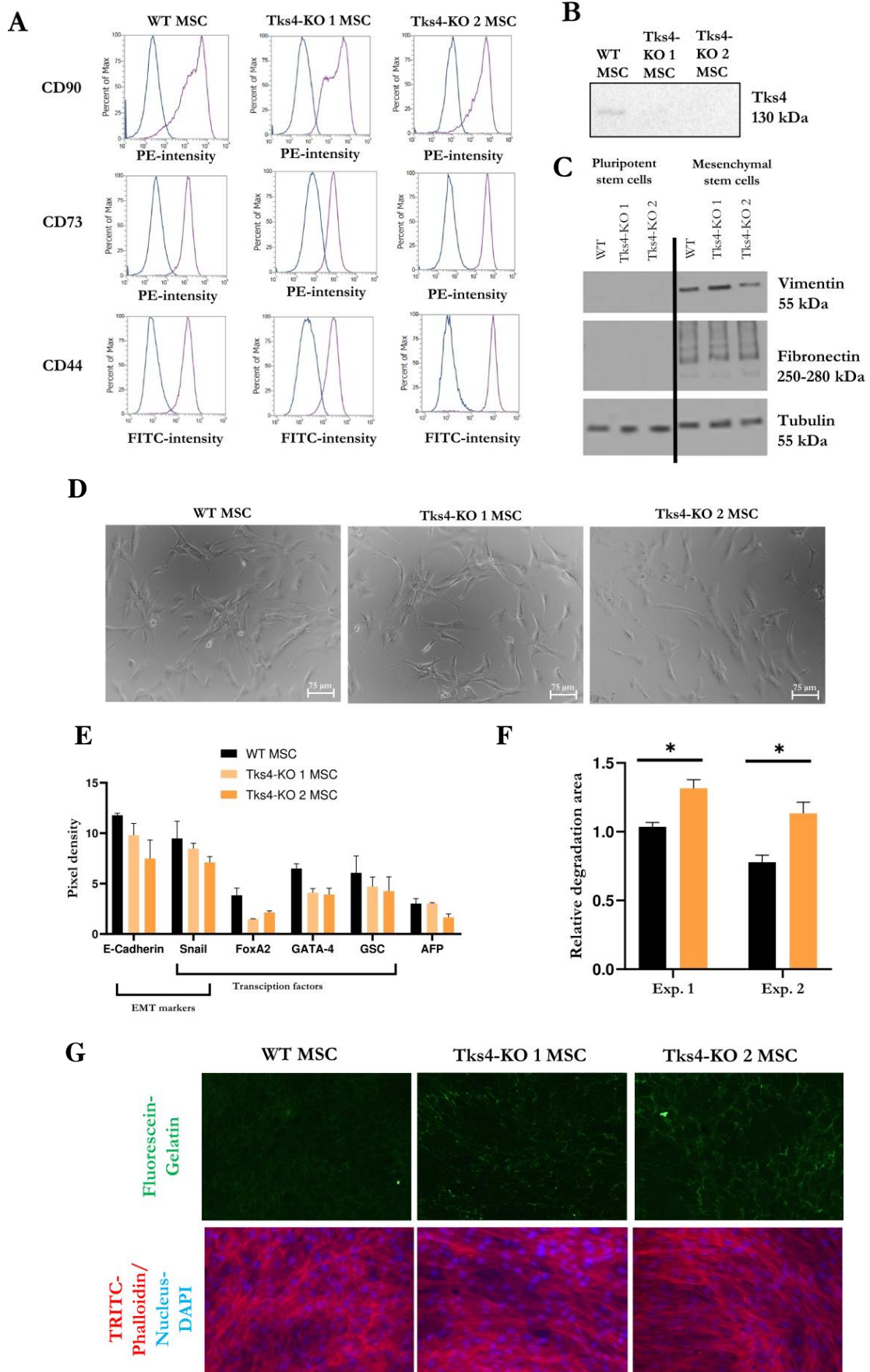
Ezután a CRISPR-Cas9 genomszerkesztési technika segítségével mutációkat hoztunk létre az SH3PXD2b gén 2. exonjában, a lenti sematikus ábra szerint és a létrejött klónok közül kiválasztottuk azokat, amelyekben homo- illetve heterozigóta módon történt meg a genomszerkesztés (39. ábra).



39. ábra: (A) Az SH3PXD2b 2. exon mutáns régiójának vázlatos áttekintése az 5. humán kromoszómán, jelezve a vezető RNS (guide RNA) komplementer szekvenciáját, a Cas9 vágási helyét és a PAM szekvenciát. (B) A TKS4-KO knock-out klónok HUES9 sejtekből történő előállításának stratégiája. A pCMV-Cas9-GFP_SH3PXD2B (Sigma-Aldrich) plazmidot nukleofekcióval juttattuk a HUES9 sejtekbe. A GFP+ sejteket 48 órával a transzfekció után szorter segítségével egysejtesen kiültettük, majd 21 klónt felszaporítottunk genomi DNS izolálás és T7 endonukleáz analízis céljából. Ezután a potenciálisan mutált 10 klón DNS-mintáiból a 2. exon érintett régióját amplifikáltuk és plazmidba klónoztuk. A homozigóta és heterozigóta mutációk megjelenését Sanger szekvenálással erősítettük meg.

Két homozigóta TKS4-KO HUES9 klónt sikerült izolálni, ahol az *SH3PXD2b* génben inszerciós-deléciós események következtében mindkét allélban stop kodonok jelentek meg. A homozigóta TKS4-KO klónok mellett két heterozigóta *SH3PXD2b* klónt is létrehoztunk. A heterozigóta HUES9 klónokban a szekvencia elemzések inszerciós-deléciós mutációt mutattak ki a Cas9 által hasított hely mellett az egyik allélban, míg a másik allél érintetlen maradt (40.B ábra). A TKS4 fehérje hiányát a homozigóta TKS4-KO és a TKS4 fehérje csökkent kifejeződését a heterozigóta HUES9 klónokban Western blot analízissel és fluoreszcens immuncitokémiával igazoltuk (38. C és D ábra).

Miután ellenőriztük a szokott módon, hogy a genomszerkesztés nem befolyásolta a klónok pluripotens tulajdonságait (pluripotencia markerek, kariotípus, spontán differenciációs képesség), a homozigóta klónokat tovább vizsgáltuk. MSC-ket hoztunk létre belőlük és ezeket is jellemeztük felszíni markereik, génexpressziójuk és funkcionális tulajdonságaik alapján. A differenciálódást követő 6. héten mind a vad típusú (WT), mind a TKS4-KO HUES9 sejtek homogén, MSC-szerű sejt morfológiát mutattak (40.D ábra). Flow citometriás méréseink alapján pozitívak lettek a mezenchimális őssejt markerekre (CD73, CD44, CD90 38.A ábra), míg nem mutatták a vérképző sejtekre (CD34, CD133), a pluripotens őssejtekre (TRA-1-81) illetve a hemopoietikus sejtekre (CD45) jellemző markereket. A Western blot analízis azt mutatta, hogy a TKS4 fehérje továbbra sem volt kimutatható a TKS4-KO MSC-ken (40.B. ábra), viszont az EMT markerek (Vimentin és Fibronectin) expressziója megemelkedett az MSC sejtekben, függetlenül a TKS4 jelenlététől vagy hiányától (40.C. ábra).



40. ábra: (A) Reprézatívtív áramlási citometriai hisztogramok, amelyek a vad típusú (WT) MSC és a két TKS4-KO MSC klón CD90, CD72 és CD44 festődését (lila vonalak) mutatják. (A kék vonalak

az izotípus kontrollt jelzik) (B) Reprezentatív Western blot, amely a TKS4 jelenlétét mutatja WT MSC sejtekben és a TKS4 fehérje hiányát a TKS4-KO MSC klónokban. (C) A Vimentin és Fibronectin EMT (és differenciálódási) markerek Western blot analízise pluripotens őssejtekben (WT és TKS4-KO) és a belőlük létrehozott MSC (WT és TKS4-KO) vonalakban. (D) A korai differenciálódási markerek (E-cadherin, Snail, FoxA2, GATA4, gooseoid (GSC), AFP fehérjeszintjei WT és TKS4-KO MSC vonalakban külön-külön elemezve a két TKS4-KO MSC-ben. (E) A megnyúlt MSC-szerű morfológia bemutatása reprezentatív átesőfényes felvételeken (75 µm skála). (F) A zselatináz vizsgálat eredményei a WT MSC és a két TKS4-KO vonal esetében. Az ábrán a lebomlási terület (a FITC-zselatin felület sötét területe) sejterületekre (TRITC-Phalloidin jelölés) vonatkoztatott mennyiségi meghatározását mutatja. A grafikonok két független biológiai párhuzamos mérés eredményei láthatók, a két KO klónt átlagoltuk (1. és 2. kísérlet). (G) A mátrix-lebontási vizsgálat reprezentatív képei, 20x objektív. A sötét területek a FITC-zselatinnal bevont tenyésztőlemezekon azt jelzik, hogy a sejtek lebontották a zselatint. A fixált lyukakat TRITC-falloiddinnel (piros szín) és DAPI-val (kék szín) festettük.

A mezenchimális differenciációs folyamatokra összpontosítva azt figyeltük meg, hogy a sejt-elköteleződéshez kapcsolódó markerek a TKS4-KO MSC klónokban jelentősen csökkentek (40.E ábra). A mezoderma markerek (Snail és FoxA2) expressziós szintjének csökkenése a TKS4-KO MSC klónokban arra utal, hogy a TKS4 hiánya esetén az MSC differenciálódás megváltozhat és kevésbé erőteljes, mint a WT sejtekben. Hasonlóképpen, a csontszövet képződésében szerepet játszó GATA4 és gooseoid (GSC) transzkripciósi faktorok szintje is alacsonyabb volt a TKS4-KO MSC-kben, mint a WT-ben, ami tovább erősíti azt az elképzelést, hogy a TKS4 hiánya lassítja a differenciálódást [235, 236]. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a TKS4 fontos szerepet játszik a csontszövet képződésében, ami összefüggésben lehet az FTHS betegek csontfejlődési defektusával. Érdekes módon az E-cadherin és a Snail szintje alacsonyabb volt a TKS4-KO MSC-kben (40.E ábra), ami arra utal, hogy a TKS4 hiánya megváltoztathatja az EMT folyamatát az MSC kialakulása során. Az EMT regulátor markerek expressziós szintjének változása mellett egy másik EMT-hez kapcsolódó jellemző a megnövekedett mátrix lebontó képesség [237]. Ezért a generált MSC klónokkal zselatináz aktivitás mérési vizsgálatot végeztünk. A 40.F. ábra azt mutatja, hogy mindkét TKS4-KO sejt nagyobb mátrixbontó aktivitást mutatott a WT-sejtekhez képest (lásd még az 40.G. ábrát). A megfigyelt EMT-szerű események (azaz megnövekedett mátrix lebontó képesség és csökkent E-Cadherin és Snail fehérje szint) a TKS4-KO hMSC-kben arra utalnak, hogy a differenciálódási folyamat kinetikája hatással lehet a TKS4 mennyiségre, ami megváltozott differenciált szöveti összetételt eredményezhet. Összefoglalva, a tanulmány legfontosabb eredménye, hogy létrehoztunk egy *in vitro* humán modellt a TKS4 fehérje hatásainak

tanulmányozására olyan őssejtekben, amelyek képesek mindhárom csíralemez irányába és így FTHS által érintett sejttípusokká is differenciálódni. A továbbiakban fontos információkat nyújthat a betegség megértésében a létrehozott MSC-k csont és zsír irányú differenciációja, de talán még ennél is érdekesebb lesz a velőcső sejtek vizsgálata (amit Laura Kerusoval (NIH) tervezünk), mivel a TKS4KO egerek és a betegek koponyafejlődése jelentős eltéréseket mutat.



*

**Hollerbach Emil grafikája*

5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása, tenyésztése és jellemzése

Létrehoztunk több humán pluripotens őssejtvonalat sejtbiológiai vizsgálatok és betegségmodellezés céljából. A sejtbiológiai vizsgálatokhoz az ABCG2 különböző mutánsainak eGFP-vel címkézett változatait kifejező őssejtvonalakat, a kalcium szignalizáció vizsgálatához pedig humán pluripotens őssejt eredetű neurális progenitorokat, amelyek a GCaMP6fast kalciumindikátor fehérjét fejezték ki. A Frank Ter Haar szindróma modellezéséhez a HUES9 embrionális őssejtvonalból a CRISPR/Cas9 génszerkesztési technikát használva létrehoztunk *SH3PXD2bgén* mutáns őssejtklonokat. II. típusú diabéteszes ikerpár vérsejtjeiből pedig Sendai vírus segítségével készítettünk indukált pluripotens őssejtvonalakat. A létrehozott vonalakat a beállított módszerekkel részletesen jellemeztük.

II. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és funkcionális vizsgálata

1. Megállapítottuk, hogy a fő multidrog transzporterek közül az ABCG2 fejeződik ki a pluripotens őssejteken. Kimutattuk továbbá, hogy az ABCG2 fehérje a pluripotens őssejtek plazmamembránjában helyezkedik el és funkcióképes. A pluripotens tenyészetekben az ABCG2 heterogén eloszlást mutatott populációs szinten (a sejtek 30-60%-a volt pozitív ABCG2-re). Az ABCG2 fehérjét kifejező sejtek aránya függött az őssejtek genetikai hátterétől és a tenyésztési körülményektől is.
2. A pluripotens őssejtek spontán illetve irányított differenciációjakor az ABCG2 szintje csökken (az SSEA4 pluripotencia markerrel párhuzamosan) és a differenciált származékok egyedi, a pluripotens őssejtektől eltérő ABC fehérje mintázatot mutatnak.
3. Az ABCG2 védelmet nyújtott a sejteket érő különböző stresszhatásokkal (drog, UV sugárzás, mechanikai behatások) szemben. Populációs szinten az ABCG2 kifejező pluripotens sejtek túléltek olyan stresszhatások között, amelyek a nem expresszáló sejtek pusztulásához vagy differenciációjához vezettek.
4. Az ABCG2 túltermelése nem változtatta meg az őssejtek pluripotenciáját és differenciációs potenciálját. Az ABCG2 túltermelés megvédte az őssejt eredetű szívizom sejteket a doxorubicin által okozott sejthaláltól.
5. A pluripotens őssejteken több olyan receptor liganddal is kalcium jelet lehet előidézni, amelyek az eukariótákban konzerváltak (tripszin, LPA, ATP, angiotenzin) és a belső kalcium raktárak ürülése kalcium beáramlást okoz a külső térből (SOCE). A kalcium jel Fluo-4 festék vagy GCaMP kalcium indikátor fehérje segítségével is mérhető, a sejt

típusának (össejt -dajkasejten vagy a nélkül - illetve differenciált származékok) és a mérés jellegének (időtartam, indukálószerke stb.) megfelelően érdemes a technikát megválasztani.

6, A pluripotens össejt-eredetű neurális sejtek kalcium jeleit Fluo-4 és GCaMP6fast kalcium indikátorok segítségével vizsgáltuk. A kétféle módszerrel mért jelek között nem találtunk szignifikáns különbségeket, azonban a GCaMP6 kevésbé volt toxikus az idegsejtekre, így hosszabb távú méréseket tett lehetővé. A neurális progenitorok vizsgálata során azt találtuk, hogy az ATP, LPA, Tripszin, és a glutamát kalciumjeleket okozott, míg a membrán depolarizációjára (KCl) nem változott a $[Ca^{2+}]_i$. A progenitorokat sikeresen differenciáltattuk Prox1 pozitív szemcsesejtekké. Ezek a neuronok teljes mértékben (gyakorlatilag 100%-ban) kifejezett kalcium jellel reagálnak a KCl okozta membránpotenciál változásra és spontán aktivitást is mutattak. A TTX-el szembeni érzékenység pedig azt mutatta, hogy ezekben az idegsejtekben a spontán kalcium aktivitás akcióspotenciál függő.

III. Pluripotens össejtek alkalmazása

1. Pluripotens össejtekből mezenchimális össejteket hoztunk létre és összehasonlítottuk csontvelő-eredetű MSC és fibroblaszt sejtekkel. Azt találtuk, hogy az össejt-eredetű MSC-k jobban hasonlítanak a csontvelő-eredetű MSC-kre, mint a fibroblasztokra mind felszíni markereik, mind differenciációs képességük tekintetében és a gyulladáscsökkentő hatásukat is ki tudtuk mutatni.

2. Humán pluripotens össejtekből a CRISPR/Cas9 génszerkesztési módszerrel létrehoztuk a Frank Ter Haar szindróma *in vitro* betegségmodelljét. Kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy az MSC differenciálódás megváltozhat és kevésbé erőteljes, mint az egészséges sejtek esetében.

6. TERVEK ÉS KITEKINTÉS

Az itt bemutatott kísérletek elsősorban alapkutatás jellegűek, céljuk a humán pluripotens őssejtek jobb megismerése volt. Egyrészt mi is ismerkedtünk az új területtel, másrészt az őssejtek gyógyításban való felhasználásához részletes és mélyreható ismeretekre van szükség. A terület nem csak a fejlődésbiológia kutatásokban hozott rohamos fejlődést, de az elmúlt években számos klinikai kipróbálás indult különböző betegségek pluripotens őssejt alapú gyógyítására. Ilyenek például az I típusú cukorbetegség, a szívelégtelenség, az öregkori vakság és a Parkinson-kór. A sejterápiás megközelítések mellett az őssejtek gyógyszerfejlesztésben való felhasználása is egyre szélesebb körben ismert és használt technikává válik. A dolgozatban tárgyalt témák összefoglalásakor igyekeztem összefoglalni azokat a vizsgálatokat, amelyekben a megszerzett ismereteket mi is gyakorlatibb célokra használtuk.

Az elmúlt pár évben a hPSC-alapú betegségmodellézés került az érdeklődésünk homlokterébe (a laboratóriumunkban létrehozott hPSC vonalak vázlatos összefoglalását lásd 5. táblázat), mivel a betegségek kutatása területén egészen új megközelítéseket tett lehetővé. A betegek szomatikus sejtjeinek visszaprogramozásával a betegre specifikus pluripotens őssejteket lehet létrehozni, ami lehetővé teszi a legkülönbözőbb sejtek érésének kutatását, de ugyanakkor a betegségben már közismerten érintett sejtípusok vizsgálatát is. A monogénes betegségekre ez a módszer sikeresen alkalmazható [73]. Mi is dolgoztunk ilyen modelleken, egyrészt a Frank Ter Haar szindróma esetében, másrészt a Creatine Transporter Deficiency esetében egy párizsi munkacsoporttal együttműködésben (Aloïse Mabondzo (Université Paris-Saclay)). A CTD-ben a kreatin hiánya súlyos fejlődési zavarokhoz és mentális retardációhoz vezet [238]. A transzporter túltermelésével a sejtek kreatin felvétele emelhető és a pluripotens őssejtekből létrehozott idegi organoidok fenotípusa menthető (publikáció előkészületben). A komplex betegségek kutatása azonban nagyobb kihívást jelent. A különböző betegekből származó sejtek különböző genetikai háttérrel rendelkeznek, ami az eredmények általánosítását és a mechanizmusok azonosítását meglehetősen nehezíti. Nagyobb betegszámú kohortok bevonása segíthet a megfelelő következtetések levonásában [239].

Más megközelítés jelent:

a. az egypetéjű ikrek vizsgálata – Ilyen vizsgálatokat folytatunk a dolgozatban bemutatott II típusú diabéteszes ikerpár esetében. Földes Gáborral (SE) együttműködésben az érlemeszesedést vizsgáljuk az iPS sejtekből endothel sejteken, míg Réthelyi Jánossal (SE) az iPS sejtekből differenciáltott idegsejteket vesszük górcső alá, hogy a betegség

idegrendszeri szövödményeit és a metformin kezelés lehetséges hatását feltérképezzük (a publikációk előkészületben).

b, a családvizsgálatok – Ilyen vizsgálatok folynak a skizofrénia kutatása területén. Réthelyi János előzetesen azonosított két családot is, ahol a beteg az idegrendszer fejlődésében szerepet játszó gén(ek)ben súlyos de novo mutációt hordoz a szülőkhöz képest. Ezekből a betegekben és szüleikben szintén iPSC vonalakat és hippokampális sejteket hoztunk létre, hogy a betegség hátterének feltárásához adatokat gyűjtsünk. Ezek az eredmények részben közöltek (Hathy et al.2020 a,b), részben előkészületben vannak publikálásra, illetve több kutatócsoporttal is együttműködésben dolgozunk a további vizsgálatokon (Jerome Mertens, Department of Molecular Biology, University of Innsbruck esetében a publikáció beküldésre is került, míg Zacharie Taoufiq az Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University kutatója és Daniella Ottosson, Lund University, esetében a sejt vonalakat bocsátottuk rendelkezésre).

A másik nagyon érdekes terület a DiGeorge szindróma kutatása, amit Földes Gáborral (SE) és közös PhD hallgatónkkal, Berecz Tündével indítottunk el. A DiGeorge-szindróma, más néven 22q11.2 deléziós szindróma (22q11.2DS), a leggyakoribb mikrodéléziós szindróma, amelynek prevalenciája 1:3000-1:6000. A betegség genetikai háttere egy monoallélikus mikrodélézió a 22-es kromoszómán, ami ~90 gén kiesését okozza (köztük fehérje és különböző RNS kódoló génekét is). Az érintett gének hemizigóta deléziója haploinsufficienciához vezet, ami a klinikai tünetek változatos megjelenését okozza, és számos szervrendszert érint. Érdekes módon a rendkívül változó fenotípusok és a tünetek súlyossága nincs összefüggésben a delézió méretével, de a súlyosság általában növekszik, ha öröklődik [240]. Az esetek hozzávetőleg 95%-a de novo delézió, míg 5%-ában autoszomális domináns módon öröklődő betegség [241]. Mi egy olyan család vérmintáiból készítettünk iPSC vonalakat, ahol a betegség három generáción át öröklődött (nagyapa, anya, gyermek) és a vártak megfelelően a betegség súlyossága egyre erősödött a generációkon keresztül. A betegek mellett az egészséges családtagok (nagyamama, apa) mintáiból is sikerült iPSC vonalakat stabilizálni. Első kérdésünk az volt, hogy lehet-e egy ilyen komplex betegséget *in vitro* modellezni? Vajon lehet-e látni a betegség súlyosbodását a generációkon át? A számunkra érdekes érintett sejt típusok a szívizom, az endothel és az idegsejtek voltak. Azt találtuk, hogy míg az iPSC-kből differenciáltatott szívizom sejtek között nem volt jelentős eltérés, addig az endothel sejtekből kialakuló hálózatok esetében az anya és a gyermek mintáiban szignifikánsan vastagabb csövecskék (tube) alakultak ki

(ami megfeleltethető a betegekben megjelent eltérő érfejlődésnek). Jelenleg az endothel differenciáció során begyűjtött mRNS minták szekvenálása folyik, ami segíteni fog a háttérben meghúzódó mechanizmusok feltárásában. A hPSC-k hippokampális és kortikális irányú differenciációjakor a progenitor populációk jelentős csökkenését figyeltük meg a gyermek esetében. Ez a megfigyelés összhangban lehet a gyermekben megfigyelt aszimmetrikus agykamra fejlődéssel. Ezeket az eredményeket is közölni tervezzük a közeljövőben. Ezzel párhuzamosan a család iPSC sejtjeiből a dúcléc (neural crest) differenciáció is megindult Laura Keruso (NIH, Washington) vezetésével. A DiGeorge-szindrómában kieső gének közül az egyik legérdekesebb a *DGCR8* (DiGeorge syndrome critical region 8). A *DGCR8* fehérje a sejtmagban található, és nélkülözhetetlen a mikroRNS (miRNS) érés első lépésében, így feltehetően az embrionális fejlődésben és a differenciációban is fontos szerepet játszik. Ennek a fehérjének a vizsgálata átvezet a betegségmodellezés következő lehetséges megközelítéséhez.

c, a genomszerkesztés – Ha betegséget okozó (vagy a kialakulásában fontos szerepet játszó) mutáció ismert, akkor lehetőségünk van a mutációt létrehozni egészséges sejtvonalban és/vagy a betegből származó sejtvonalban kijavítani. Az így létrehozott sejtvonalak azonos genetikai háttérrel rendelkeznek, azaz izogenikusak. Az ilyen vonalak vizsgálata több előnnyel is jár [242]. A *DGCR8* vizsgálatoknál egészséges hESC vonalban hoztunk létre mutációt és vizsgáltuk a mikroRNS érést Orbán Tamás (TTK) együttműködésével (Reé et al. 2020 és 2022). Míg a skizofrénia vizsgálatoknál a beteg iPSC sejtvonalban megtalálható *ZMYND11* (Zinc Finger MYND-Type Containing 11) génben található mutációt javítottuk ki, illetve hoztuk létre egy genetikailag független iPSC vonalban (Réthelyi János (SE) együttműködésével és Szűts Dávid (TTK) segítségével). Az így létrehozott izogenikus iPSC vonalakat hippokampális progenitorokká és idegsejteké differenciáltattuk, majd vizsgáltuk az mRNS expressziós profilokat, a kalcium szignalizációt és az idegi hálózatok kialakulását MEA (multielektrod array) segítségével. Ez vizsgálatsorozat jelenleg is zajlik, de tervezzük, hogy eredményeinket hamarosan közzé is tesszük.

A betegségmodellezés a jövőben is fontos téma lesz a laboratóriumunkban, de érdeklődésünk a konkrétabb hasznosítások felé is nyitott; mint például az iPSC eredetű szívizomsejtek farmakológiai vizsgálata (Görbe Anikó (SE)) vagy a vér-agy gát humán modelljének létrehozása (Pirity Melinda és Deli Mária (SZBK)).

5. táblázat A laboratóriumunkban létrehozott hPSC vonalak vázlatos összefoglalása

Betegség	Gén(ek)	hPSC vonalak	Differenciáció	Publikáció	Együttműködés
Skizofrénia	KHSRP/LLRC7 (<i>de novo</i> pontmutáció)	Beteg (1) Kontroll (szülők) (2)	Spontán, hippokampális kortikális	Hathy 2020 a,b Szabó 2020 beküldve	Réthelyi János (SE) Jerome Mertens (Innsbruck)
	ZMYND 11 (<i>de novo</i> pontmutáció)	Beteg (1)/javított CRISPR-ral (1) Kontroll (1)/frame shift KO (2) Kontroll (szülők) (2)	Spontán, hippokampális	előkészületben	Réthelyi János (SE) Szűts Dávid (TTK)
DiGeorge szindróma	mikrodeléción	Beteg (3) Kontroll (szülők) (2)	Spontán, szívizom enothel, idegi	előkészületben	Földes Gábor (SE) Réthelyi János (SE) Laura Kerouso (NIH) Thomas Eschenhagen (Hamburg)
	DGCR8 (heterozigóta)	KO-GFP / frame shift-CRISPR (1)	Spontán	Reé et al. 2020 Reé et al. 2022	Orbán Tamás (TTK)
II típusú cukorbetegség	NA	Beteg (2-egypetűjű ikrek)	Spontán, enothel, idegi	Szabó et al. 2020 előkészületben	Földes Gábor (SE) Réthelyi János (SE)
Frank-Ter-Haar szindróma	TKS4 (homo/heterozigóta)	HUES9-KO (frame shift- CRISPR/4)	Spontán	László et al. 2022	Buday László, Vass Virág (TTK)
Skraban-Deardorff szindróma	<i>WDR26</i> – mikrodeléción	Beteg (1)	Spontán	előkészületben	Dezső Dávid (Lisbon)
Creatine Transporter Deficiency	CTD- SLC6A8 pontmutációk	Beteg (3) Kontroll (1) SLC6A8-túlexpresszálo klónok (9)	Idegi	előkészületben	Sarkadi Balázs (TTK) Aloise Mabondzo (Paris)

7. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

A dolgozatomban a PhD fokozatom megszerzése (2003) után született, már megjelent első vagy utolsó szerzős közleményeimet használtam fel.

1. Szabó E, Reé D, Jezsó B, Vincze K, Földes G, Molnár AÁ, Réthelyi JM, **Apáti Á.** Generation of iPSC lines from peripheral blood mononuclear cells of identical twins both suffering from type 2 diabetes mellitus and one of them additionally diagnosed with atherosclerosis. *Stem Cell Res.* 2020 Dec;49:102051. doi:10.1016/j.scr.2020.102051. Epub 2020 Oct 15. PMID: 33099106.

IF:2,02

2. **Apáti A,** Orbán TI, Varga N, Németh A, Schamberger A, Krizsik V, Erdélyi-Belle B, Homolya L, Várady G, Padányi R, Karászi E, Kemna EW, Német K, Sarkadi B. High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2008 Dec;1778(12):2700-9. doi: 10.1016/j.bbamem.2008.08.010. Epub 2008 Aug 20. PMID:18793608.

IF:4,543

Független idéző: 47

3. Sarkadi B, Orbán TI, Szakács G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, **Apáti A.** Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? *Stem Cells.* 2010 Jan;28(1):174-6. doi:10.1002/stem.262. PMID: 19924769.

IF: 8,751

Független idéző: 15

4. Erdei Z, Sarkadi B, Brózik A, Szebényi K, Várady G, Makó V, Péntek A, Orbán TI, **Apáti Á.** Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response. *Eur Biophys J.* 2013 Mar;42(2-3):169-79. doi: 10.1007/s00249-012-0838-0. Epub 2012 Aug 1. PMID: 22851001.

IF: 2,592

Független idéző: 16

5. Erdei Z, Lőrincz R, Szebényi K, Péntek A, Varga N, Likó I, Várady G, Szakács G, Orbán TI, Sarkadi B, **Apáti A.** Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom.* 2014 Sep;86(5):299-310. doi: 10.1002/cyto.b.21168. Epub 2014 Apr 11. PMID: 24729538.

IF: 2,461

Független idéző: 12

6. Erdei Z, Schamberger A, Török G, Szebényi K, Várady G, Orbán TI, Homolya L, Sarkadi B, **Apáti Á.** Generation of multidrug resistant human tissues by overexpression of

the ABCG2 multidrug transporter in embryonic stem cells. PLoS One. 2018 Apr 12;13(4):e0194925. doi: 10.1371/journal.pone.0194925. PMID: 29649238; PMCID: PMC5896897.

IF: 2,776

Független idéző: 6

7. **Apáti Á**, Pászty K, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Sarkadi B. Calcium signaling in pluripotent stem cells. Mol Cell Endocrinol. 2012 Apr 28;353(1-2):57-67. doi: 10.1016/j.mce.2011.08.038. Epub 2011 Sep 14. PMID:21945604.

IF: 4,555

Független idéző:22

8. **Apáti Á**, Pászty K, Hegedűs L, Kolacsek O, Orbán TI, Erdei Z, Szebényi K, Péntek A, Enyedi Á, Sarkadi B. Characterization of calcium signals in human embryonic stem cells and in their differentiated offspring by a stably integrated calcium indicator protein. Cell Signal. 2013 Apr;25(4):752-9. doi:10.1016/j.cellsig.2012.12.024. Epub 2013 Jan 7. PMID: 23305950.

IF: 4,471

Független idéző: 12

9. Vőfély G, Berecz T, Szabó E, Szebényi K, Hathy E, Orbán TI, Sarkadi B, Homolya L, Marchetto MC, Réthelyi JM, **Apáti Á**.* Characterization of calcium signals in human induced pluripotent stem cell-derived dentate gyrus neuronal progenitors and mature neurons, stably expressing an advanced calcium indicator protein. Mol Cell Neurosci. 2018 Apr;88:222-230. doi: 10.1016/j.mcn.2018.02.003. Epub 2018 Feb 6. PMID: 29425968.

IF: 2,855

Független idéző: 4

10 Varga N, Veréb Z, Rajnavölgyi E, Németh K, Uher F, Sarkadi B, **Apáti A**. Mesenchymal stem cell like (MSCl) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. Biochem Biophys Res Commun. 2011 Oct 28;414(3):474-80. doi: 10.1016/j.bbrc.2011.09.089. Epub 2011 Sep 24. PMID:21971558.

IF: 2,804

Független idéző: 15

11. László L, Maczelka H, Takács T, Kurilla A, Tilajka Á, Buday L, Vas V, **Apáti Á***. A Novel Cell-Based Model for a Rare Disease: The TKS4-KO Human Embryonic StemCell Line as a Frank-Ter Haar Syndrome Model System. Int J Mol Sci. 2022 Aug8;23(15):8803. doi: 10.3390/ijms23158803. PMID: 35955935; PMCID: PMC9369304.

IF: 6,208* (2021)

*: megosztott első vagy utolsó szerző

8. A DISSZERTÁCIÓHOZ KAPCSOLÓDÓ TOVÁBBI KÖZLEMÉNYEK

1: Reé D, Fóthi Á, Varga N, Kolacsek O, Orbán TI, Apáti Á. Partial Disturbance of Microprocessor Function in Human Stem Cells Carrying a Heterozygous Mutation in the DGCR8 Gene. *Genes* (Basel). 2022 Oct 23;13(11):1925. doi: 10.3390/genes13111925. PMID: 36360162; PMCID: PMC9689658.

2: Lilienberg J, Apáti Á, Réthelyi JM, Homolya L. Microglia modulate proliferation, neurite generation and differentiation of human neural progenitor cells. *Front Cell Dev Biol*. 2022 Oct 13;10:997028. doi: 10.3389/fcell.2022.997028. PMID: 36313581; PMCID: PMC9606406.

3: Kolacsek O, Wachtl G, Fóthi Á, Schamberger A, Sándor S, Pergel E, Varga N, Raskó T, Izsvák Z, Apáti Á, Orbán TI. Functional indications for transposase domestications - Characterization of the human piggyBac transposase derived (PGBD) activities. *Gene*. 2022 Aug 5;834:146609. doi: 10.1016/j.gene.2022.146609. Epub 2022 May 21. PMID: 35609796.

4: Onódi Z, Visnovitz T, Kiss B, Hambalkó S, Koncz A, Ágg B, Váradi B, Tóth VÉ, Nagy RN, Gergely TG, Gergő D, Makkos A, Pelyhe C, Varga N, Reé D, Apáti Á, Leszek P, Kovács T, Nagy N, Ferdinandy P, Buzás EI, Görbe A, Giricz Z, Varga ZV. Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *J Mol Cell Cardiol*. 2022 Apr;165:19-30. doi: 10.1016/j.yjmcc.2021.12.007. Epub 2021 Dec 24. PMID: 34959166.

5: Berecz T, Yiu A, Vittay O, Orsolits B, Mioulane M, Dos Remedios CG, Ketteler R, Merkely B, Apáti Á, Harding SE, Hellen N, Foldes G. Transcriptional co-activators YAP1-TAZ of Hippo signalling in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *ESC Heart Fail*. 2022 Feb;9(1):224-235. doi: 10.1002/ehf2.13756. Epub 2021 Dec 21. PMID: 34931757; PMCID: PMC8787991.

6: Izadifar M, Berecz T, Apáti Á, Nagy A. An Optical-Flow-Based Method to Quantify Dynamic Behavior of Human Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes in Disease Modeling Platforms. *Methods Mol Biol*. 2022;2454:213-230. doi: 10.1007/7651_2021_382. PMID: 33982275.

7: Szabó E, Juhász F, Homolya L, Erdei Z, Apáti Á. Generation of Human Neural Progenitors from Blood Samples by Interrupted Reprogramming. *Methods Mol Biol*. 2022;2454:241-255. doi: 10.1007/7651_2021_386. PMID: 33826126.

- 8: Lilienberg J, Hegyi Z, Szabó E, Hathy E, Málnási-Csizmadia A, Réthelyi JM, Apáti Á, Homolya L. Pharmacological Modulation of Neurite Outgrowth in Human Neural Progenitor Cells by Inhibiting Non-muscle Myosin II. *Front Cell Dev Biol.* 2021 Sep 17;9:719636. doi: 10.3389/fcell.2021.719636. PMID: 34604221; PMCID: PMC8484915.
- 9: Fóthi Á, Biró O, Erdei Z, Apáti Á, Orbán TI. Tissue-specific and transcription-dependent mechanisms regulate primary microRNA processing efficiency of the human chromosome 19 MicroRNA cluster. *RNA Biol.* 2021 Aug;18(8):1170-1180. doi: 10.1080/15476286.2020.1836457. Epub 2020 Oct 23. PMID: 33052778; PMCID: PMC8244754.
- 10: Mázló A, Kovács R, Miltner N, Tóth M, Veréb Z, Szabó K, Bacskai I, Pázmándi K, Apáti Á, Biró T, Bene K, Rajnavölgyi É, Bácsi A. MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-/IL-10-producing T cells via CTLA-4. *iScience.* 2021 Mar 15;24(4):102312. doi: 10.1016/j.isci.2021.102312. PMID: 33855282; PMCID: PMC8027231.
- 11: Hathy E, Szabó E, Vincze K, Haltrich I, Kiss E, Varga N, Erdei Z, Várady G, Homolya L, Apáti Á, Réthelyi JM. Generation of multiple iPSC clones from a male schizophrenia patient carrying de novo mutations in genes KHSRP, LRRC7, and KIR2DL1, and his parents. *Stem Cell Res.* 2021 Mar;51:102140. doi: 10.1016/j.scr.2020.102140. Epub 2020 Dec 25. PMID: 33503521.
- 12: Reé D, Borsy A, Fóthi Á, Orbán TI, Várady G, Erdei Z, Sarkadi B, Réthelyi J, Varga N, Apáti Á. Establishing a human embryonic stem cell clone with a heterozygous mutation in the DGCR8 gene. *Stem Cell Res.* 2020 Dec 22;50:102134. doi: 10.1016/j.scr.2020.102134. Epub ahead of print. PMID: 33360445.
- 13: Szabó E, Juhász F, Hathy E, Reé D, Homolya L, Erdei Z, Réthelyi JM, Apáti Á. Functional Comparison of Blood-Derived Human Neural Progenitor Cells. *Int J Mol Sci.* 2020 Nov 30;21(23):9118. doi: 10.3390/ijms21239118. PMID: 33266139; PMCID: PMC7730078.
- 14: Hathy E, Szabó E, Varga N, Erdei Z, Tordai C, Czehlár B, Baradits M, Jezsó B, Koller J, Nagy L, Molnár MJ, Homolya L, Nemoda Z, Apáti Á, Réthelyi JM. Investigation of de novo mutations in a schizophrenia case-parent trio by induced pluripotent stem cell-based in vitro disease modeling: convergence of schizophrenia- and autism-related cellular phenotypes. *Stem Cell Res Ther.* 2020 Nov 27;11(1):504. doi: 10.1186/s13287-020-01980-5. PMID: 33246498; PMCID: PMC7694414.

- 15: Török G, Erdei Z, Lilienberg J, Apáti Á, Homolya L. The importance of transporters and cell polarization for the evaluation of human stem cell-derived hepatic cells. *PLoS One*. 2020 Jan 23;15(1):e0227751. doi: 10.1371/journal.pone.0227751. PMID: 31971960; PMCID: PMC6977753.
- 16: Berecz T, Husvéth-Tóth M, Mioulane M, Merkely B, Apáti Á, Földes G. Generation and Analysis of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Endothelial Cells for High Content Screening Purposes. *Methods Mol Biol*. 2020;2150:57-77. doi: 10.1007/7651_2019_222. PMID: 30941720.
- 17: Apáti Á, Varga N, Berecz T, Erdei Z, Homolya L, Sarkadi B. Application of human pluripotent stem cells and pluripotent stem cell-derived cellular models for assessing drug toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2019 Jan;15(1):61-75. doi: 10.1080/17425255.2019.1558207. Epub 2018 Dec 17. PMID: 30526128.
- 18: Sándor S, Jordanidisz T, Schamberger A, Várady G, Erdei Z, Apáti Á, Sarkadi B, Orbán TI. Functional characterization of the ABCG2 5' non-coding exon variants: Stem cell specificity, translation efficiency and the influence of drug selection. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Jul;1859(7):943-51. doi: 10.1016/j.bbagr.2016.05.007. Epub 2016 May 15. PMID: 27191194.
- 19: Apáti Á, Berecz T, Sarkadi B. Calcium signaling in human pluripotent stem cells. *Cell Calcium*. 2016 Mar;59(2-3):117-23. doi: 10.1016/j.ceca.2016.01.005. Epub 2016 Feb 17. PMID: 26922096.
- 20: Pálóczi J, Varga ZV, Apáti Á, Szabéniyi K, Sarkadi B, Madonna R, De Caterina R, Csont T, Eschenhagen T, Ferdinandy P, Görbe A. Exogenous Nitric Oxide Protects Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes against Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev*. 2016;2016:4298945. doi: 10.1155/2016/4298945. Epub 2016 Jun 15. PMID: 27403231; PMCID: PMC4925993.
- 21: Apáti Á, Szabéniyi K, Erdei Z, Várady G, Orbán TI, Sarkadi B. The importance of drug transporters in human pluripotent stem cells and in early tissue differentiation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2016;12(1):77-92. doi: 10.1517/17425255.2016.1121382. Epub 2015 Dec 14. PMID: 26592535.
- 22: Péntek A, Pászty K, Apáti Á. Analysis of Intracellular Calcium Signaling in Human Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol*. 2016;1307:141-7. doi: 10.1007/7651_2014_68. PMID: 24482125.

23: Erdélyi-Belle B, Török G, Apáti Á, Sarkadi B, Schaff Z, Kiss A, Homolya L. Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *Pathol Oncol Res.* 2015 Sep;21(4):1059-70. doi: 10.1007/s12253-015-9936-5. Epub 2015 Apr 7. PMID: 25845432.

24: Bacskai I, Mázló A, Kis-Tóth K, Szabó A, Panyi G, Sarkadi B, Apáti Á, Rajnavölgyi É. Mesenchymal Stromal Cell-Like Cells Set the Balance of Stimulatory and Inhibitory Signals in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev.* 2015 Aug 1;24(15):1805-16. doi: 10.1089/scd.2014.0509. Epub 2015 Apr 29. PMID: 25808140.

25: Szabéenyi K, Péntek A, Erdei Z, Várady G, Orbán TI, Sarkadi B, Apáti Á. Efficient generation of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors based on tissue-specific enhanced green fluorescence protein expression. *Tissue Eng Part C Methods.* 2015 Jan;21(1):35-45. doi: 10.1089/ten.TEC.2013.0646. PMID: 24734786; PMCID: PMC4291086.

26: Szabéenyi K, Erdei Z, Péntek A, Sebe A, Orbán TI, Sarkadi B, Apáti Á. Human pluripotent stem cells in pharmacological and toxicological screening: new perspectives for personalized medicine. *Per Med.* 2011 May;8(3):347-364. doi: 10.2217/pme.11.19. PMID: 29783530.

27: Orbán TI, Apáti A, Németh A, Varga N, Krizsik V, Schamberger A, Szabéenyi K, Erdei Z, Várady G, Karászi E, Homolya L, Német K, Gócza E, Miskey C, Mátés L, Ivics Z, Izsvák Z, Sarkadi B. Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells.* 2009 May;27(5):1077-87. doi: 10.1002/stem.45. PMID: 19415778.

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Először a Humán pluripotens összejt labor munkatársainak szeretném megköszönni a közös éveket, mivel nélkülük ez a munka nem jöhetett volna létre! Haraszi Beáta nélkül, akinél jobb asszisztenst elképzelni se tudok, sem az én sem a hallgatók munkája nem lenne ennyire sikeres és nyugodt.

Az első PhD hallgatók a laborban; Varga Nóra, Szabó Kornélia és Erdei Zsuzsa (mára már PhD-val és néhány csemetével gazdagabb az életük), rajtuk tanultam meg, hogy hogyan kell egy csapatot vezetni. Őket követte Szabó Eszter, Berecz Tünde és Reé Dóra, akiknek már könnyebb dolga volt az összejtekkel (és talán velem is). A jelenlegi PhD hallgatók, Jezsó Bálint, Vincze Katalin, Tordai Csongor és Maczelka Hédi, akik megtűrnek a laborban, ha sejtezni támad kedvem, lelkesedésükkel és kemény munkájukkal motiválnak minden nap. A név szerint megemlégetteken kívül több hallgatóval dolgoztam együtt, a gimnazista „nyári munkások”-tól kezdve, a BSc és MSc hallgatókon keresztül a PhD hallgatókig bezárólag, akiktől sokat tanultam és remélem Ők is tőlem.

Hálás köszönetem Orbán Tamásnak, Réthelyi Jánosnak és Földes Gábornak, akikkel sok érdekes közös témánk van és az együttműködésük sokat emelt a kutatásaink színvonalán. Élmény veletek együtt dolgozni!

Köszönöm szépen a Biomembrán közösség minden tagjának, hogy a kezdetektől fogva támogattak és többen barátságukkal is megtiszteltek; elsősorban Sarkadi Baláznak, aki ezt a témát felvetette, szakmailag és anyagilag támogatta, hosszú ideig munkahelyi vezetőm volt és mentoromnak tekinthetem azóta is. Rieth Katalinnak, Német Katalinnak, Papp Bélának, Várady Györgynek, Welker Ervinnek és Homolya Lászlónak is köszönettel tartozom a segítségért és a hasznos szakmai tanácsokért.

Hálás vagyok az együttműködő kollégáimnak itthon és külföldön egyaránt.

Köszönöm a mindenkor munkahelyemnek (OVSZ - vagy ahogy éppen hívták- és a Természettudományi Kutatóközpont) a kutatásainkhoz biztosított háttérrel és a támogatást mindazon szakmai szervezeteknek, amelyek révén a bemutatott projektek folyamatos pénzügyi támogatást élveztek.

Hálásan köszönöm a családomnak és barátaimnak, a meg nem szűnő támogatást és szeretetet; édesanyámnak (aki mindig ott volt helyettem, amikor én dolgoztam), gyermekeimnek (az örömet, amit jelentenek és Emnek a grafikákat külön is!), páromnak az inspiráló vitákat és öcsémnek, a finom falatokat.

Végül, de nem utolsósorban, kedves Olvasó, köszönöm a megtisztelő figyelmet!

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Elkind, N. B.; Szentpetery, Z.; Apati, A.; Ozvegy-Laczka, C.; Varady, G.; Ujhelly, O.; Szabo, K.; Homolya, L.; Varadi, A.; Buday, L.; Keri, G.; Nemet, K.; Sarkadi, B. Multidrug transporter ABCG2 prevents tumor cell death induced by the epidermal growth factor receptor inhibitor Iressa (ZD1839, Gefitinib). *Cancer Res* **2005**, *65*, 1770-7.10.1158/0008-5472.CAN-04-3303
2. Szebenyi, K.; Furedi, A.; Kolacsek, O.; Pergel, E.; Bosze, Z.; Bender, B.; Vajdovich, P.; Tovari, J.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Heja, L.; Enyedi, A.; Sarkadi, B.; Apati, A.; Orban, T. I. Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep* **2015**, *5*, 12645.10.1038/srep12645
3. Szebenyi, K.; Furedi, A.; Kolacsek, O.; Csohany, R.; Prokai, A.; Kis-Petik, K.; Szabo, A.; Bosze, Z.; Bender, B.; Tovari, J.; Enyedi, A.; Orban, T. I.; Apati, A.; Sarkadi, B. Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol* **2015**, *26*, 2731-40.10.1681/ASN.2014070705
4. Evans, M. J.; Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **1981**, *292*, 154-6.10.1038/292154a0
5. Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145-7.10.1126/science.282.5391.1145
6. Solter, D.; Knowles, B. B. Immunosurgery of mouse blastocyst. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1975**, *72*, 5099-102.10.1073/pnas.72.12.5099
7. Reubinoff, B. E.; Pera, M. F.; Fong, C. Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* **2000**, *18*, 399-404.10.1038/74447
8. Itskovitz-Eldor, J.; Schuldiner, M.; Karsenti, D.; Eden, A.; Yanuka, O.; Amit, M.; Soreq, H.; Benvenisty, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* **2000**, *6*, 88-95, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10859025>
9. Kehat, I.; Kenyagin-Karsenti, D.; Snir, M.; Segev, H.; Amit, M.; Gepstein, A.; Livne, E.; Binah, O.; Itskovitz-Eldor, J.; Gepstein, L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 407-14.10.1172/JCI12131
10. Carpenter, M. K.; Inokuma, M. S.; Denham, J.; Mujtaba, T.; Chiu, C. P.; Rao, M. S. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* **2001**, *172*, 383-97.10.1006/exnr.2001.7832
11. Assady, S.; Maor, G.; Amit, M.; Itskovitz-Eldor, J.; Skorecki, K. L.; Tzukerman, M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **2001**, *50*, 1691-7.10.2337/diabetes.50.8.1691
12. Zhang, S. C.; Wernig, M.; Duncan, I. D.; Brustle, O.; Thomson, J. A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **2001**, *19*, 1129-33.10.1038/nbt1201-1129
13. Boyer, L. A.; Lee, T. I.; Cole, M. F.; Johnstone, S. E.; Levine, S. S.; Zucker, J. P.; Guenther, M. G.; Kumar, R. M.; Murray, H. L.; Jenner, R. G.; Gifford, D. K.; Melton, D. A.; Jaenisch, R.; Young, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005**, *122*, 947-56.10.1016/j.cell.2005.08.020
14. Ginis, I.; Luo, Y.; Miura, T.; Thies, S.; Brandenberger, R.; Gerecht-Nir, S.; Amit, M.; Hoke, A.; Carpenter, M. K.; Itskovitz-Eldor, J.; Rao, M. S. Differences between human and mouse embryonic stem cells. *Dev Biol* **2004**, *269*, 360-80.10.1016/j.ydbio.2003.12.034

15. Tesar, P. J.; Chenoweth, J. G.; Brook, F. A.; Davies, T. J.; Evans, E. P.; Mack, D. L.; Gardner, R. L.; McKay, R. D. New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature* **2007**, *448*, 196-9.10.1038/nature05972
16. Nichols, J.; Smith, A. Naive and primed pluripotent states. *Cell Stem Cell* **2009**, *4*, 487-92.10.1016/j.stem.2009.05.015
17. Bao, S.; Tang, F.; Li, X.; Hayashi, K.; Gillich, A.; Lao, K.; Surani, M. A. Epigenetic reversion of post-implantation epiblast to pluripotent embryonic stem cells. *Nature* **2009**, *461*, 1292-5.10.1038/nature08534
18. Gafni, O.; Weinberger, L.; Mansour, A. A.; Manor, Y. S.; Chomsky, E.; Ben-Yosef, D.; Kalma, Y.; Viukov, S.; Maza, I.; Zviran, A.; Rais, Y.; Shipony, Z.; Mukamel, Z.; Krupalnik, V.; Zerbib, M.; Geula, S.; Caspi, I.; Schneir, D.; Shwartz, T.; Gilad, S.; Amann-Zalcenstein, D.; Benjamin, S.; Amit, I.; Tanay, A.; Massarwa, R.; Novershtern, N.; Hanna, J. H. Derivation of novel human ground state naive pluripotent stem cells. *Nature* **2013**, *504*, 282-6.10.1038/nature12745
19. Wang, J.; Xie, G.; Singh, M.; Ghanbarian, A. T.; Rasko, T.; Szvetnik, A.; Cai, H.; Besser, D.; Prigione, A.; Fuchs, N. V.; Schumann, G. G.; Chen, W.; Lorincz, M. C.; Ivics, Z.; Hurst, L. D.; Izsvak, Z. Primate-specific endogenous retrovirus-driven transcription defines naive-like stem cells. *Nature* **2014**, *516*, 405-9.10.1038/nature13804
20. Fischer, L. A.; Khan, S. A.; Theunissen, T. W. Induction of Human Naive Pluripotency Using 5i/L/A Medium. *Methods Mol Biol* **2022**, *2416*, 13-28.10.1007/978-1-0716-1908-7_2
21. Ware, C. B.; Nelson, A. M.; Mecham, B.; Hesson, J.; Zhou, W.; Jonlin, E. C.; Jimenez-Caliani, A. J.; Deng, X.; Cavanaugh, C.; Cook, S.; Tesar, P. J.; Okada, J.; Margaretha, L.; Sperber, H.; Choi, M.; Blau, C. A.; Treuting, P. M.; Hawkins, R. D.; Cirulli, V.; Ruohola-Baker, H. Derivation of naive human embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2014**, *111*, 4484-9.10.1073/pnas.1319738111
22. Strawbridge, S. E.; Clarke, J.; Guo, G.; Nichols, J. Deriving Human Naive Embryonic Stem Cell Lines from Donated Supernumerary Embryos Using Physical Distancing and Signal Inhibition. *Methods Mol Biol* **2022**, *2416*, 1-12.10.1007/978-1-0716-1908-7_1
23. Hoffman, L. M.; Carpenter, M. K. Characterization and culture of human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **2005**, *23*, 699-708.10.1038/nbt1102
24. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663-76.10.1016/j.cell.2006.07.024
25. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861-72.10.1016/j.cell.2007.11.019
26. Lowry, W. E.; Plath, K. The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1246-8.10.1038/nbt1108-1246
27. Mostoslavsky, G. Concise review: The magic act of generating induced pluripotent stem cells: many rabbits in the hat. *Stem Cells* **2012**, *30*, 28-32.10.1002/stem.742
28. Woltjen, K.; Michael, I. P.; Mohseni, P.; Desai, R.; Mileikovsky, M.; Hamalainen, R.; Cowling, R.; Wang, W.; Liu, P.; Gertsenstein, M.; Kaji, K.; Sung, H. K.; Nagy, A. piggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature* **2009**, *458*, 766-70.10.1038/nature07863
29. Xu, C.; Jiang, J.; Sottile, V.; McWhir, J.; Lebkowski, J.; Carpenter, M. K. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* **2004**, *22*, 972-80.10.1634/stemcells.22-6-972
30. Watanabe, K.; Ueno, M.; Kamiya, D.; Nishiyama, A.; Matsumura, M.; Wataya, T.; Takahashi, J. B.; Nishikawa, S.; Nishikawa, S.; Muguruma, K.; Sasai, Y. A ROCK inhibitor permits survival of dissociated human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 681-6.10.1038/nbt1310

31. Martins-Taylor, K.; Xu, R. H. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **2012**, *30*, 22-7.10.1002/stem.705
32. Zhu, Z.; Huangfu, D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development* **2013**, *140*, 705-17.10.1242/dev.086165
33. Worley, K. E.; Rico-Varela, J.; Ho, D.; Wan, L. Q. Teratogen screening with human pluripotent stem cells. *Integr Biol (Camb)* **2018**, *10*, 491-501.10.1039/c8ib00082d
34. Sison-Young, R. L.; Kia, R.; Heslop, J.; Kelly, L.; Rowe, C.; Cross, M. J.; Kitteringham, N. R.; Hanley, N.; Park, B. K.; Goldring, C. E. Human pluripotent stem cells for modeling toxicity. *Adv Pharmacol* **2012**, *63*, 207-56.10.1016/B978-0-12-398339-8.00006-9
35. Engle, S. J.; Blaha, L.; Kleiman, R. J. Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron* **2018**, *100*, 783-797.10.1016/j.neuron.2018.10.033
36. Karagiannis, P.; Takahashi, K.; Saito, M.; Yoshida, Y.; Okita, K.; Watanabe, A.; Inoue, H.; Yamashita, J. K.; Todani, M.; Nakagawa, M.; Osawa, M.; Yashiro, Y.; Yamanaka, S.; Osafune, K. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev* **2019**, *99*, 79-114.10.1152/physrev.00039.2017
37. Lancaster, M. A.; Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **2014**, *345*, 1247125.10.1126/science.1247125
38. Turek, I. S.; Hanlon, T. E. The effectiveness and safety of electroconvulsive therapy (ECT). *J Nerv Ment Dis* **1977**, *164*, 419-31.10.1097/00005053-197706000-00008
39. Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* **2020**, *27*, 523-531.10.1016/j.stem.2020.09.014
40. Harding, J.; Vintersten-Nagy, K.; Nagy, A. Universal Stem Cells: Making the Unsafe Safe. *Cell Stem Cell* **2020**, *27*, 198-199.10.1016/j.stem.2020.07.004
41. Lanza, R.; Russell, D. W.; Nagy, A. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat Rev Immunol* **2019**, *19*, 723-733.10.1038/s41577-019-0200-1
42. Liang, Q.; Monetti, C.; Shutova, M. V.; Neely, E. J.; Hacibekiroglu, S.; Yang, H.; Kim, C.; Zhang, P.; Li, C.; Nagy, K.; Mileikovsky, M.; Gyongy, I.; Sung, H. K.; Nagy, A. Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety. *Nature* **2018**, *563*, 701-704.10.1038/s41586-018-0733-7
43. Desgres, M.; Menasche, P. Clinical Translation of Pluripotent Stem Cell Therapies: Challenges and Considerations. *Cell Stem Cell* **2019**, *25*, 594-606.10.1016/j.stem.2019.10.001
44. Kelava, I.; Lancaster, M. A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol* **2016**, *420*, 199-209.10.1016/j.ydbio.2016.06.037
45. Lancaster, M. A.; Renner, M.; Martin, C. A.; Wenzel, D.; Bicknell, L. S.; Hurles, M. E.; Homfray, T.; Penninger, J. M.; Jackson, A. P.; Knoblich, J. A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **2013**, *501*, 373-9.10.1038/nature12517
46. Marton, R. M.; Pasca, S. P. Organoid and Assembloid Technologies for Investigating Cellular Crosstalk in Human Brain Development and Disease. *Trends Cell Biol* **2020**, *30*, 133-143.10.1016/j.tcb.2019.11.004
47. Kanton, S.; Boyle, M. J.; He, Z.; Santel, M.; Weigert, A.; Sanchis-Calleja, F.; Guijarro, P.; Sidow, L.; Fleck, J. S.; Han, D.; Qian, Z.; Heide, M.; Huttner, W. B.; Khaitovich, P.; Paabo, S.; Treutlein, B.; Camp, J. G. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. *Nature* **2019**, *574*, 418-422.10.1038/s41586-019-1654-9
48. Shroff, T.; Aina, K.; Maass, C.; Cipriano, M.; Lambrecht, J.; Tacke, F.; Mosig, A.; Loskill, P. Studying metabolism with multi-organ chips: new tools for disease modelling, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Open Biol* **2022**, *12*, 210333.10.1098/rsob.210333
49. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **1997**, *276*, 71-4.10.1126/science.276.5309.71

50. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143-7.10.1126/science.284.5411.143
51. Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansorge, W.; Ho, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **2005**, *33*, 1402-16.10.1016/j.exphem.2005.07.003
52. Wang, H. S.; Hung, S. C.; Peng, S. T.; Huang, C. C.; Wei, H. M.; Guo, Y. J.; Fu, Y. S.; Lai, M. C.; Chen, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **2004**, *22*, 1330-7.10.1634/stemcells.2004-0013
53. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315-7.10.1080/14653240600855905
54. Zhou, T.; Yuan, Z.; Weng, J.; Pei, D.; Du, X.; He, C.; Lai, P. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol* **2021**, *14*, 24.10.1186/s13045-021-01037-x
55. de Matos, B. M.; Robert, A. W.; Stimamiglio, M. A.; Correa, A. Pluripotent-derived Mesenchymal Stem/stromal Cells: an Overview of the Derivation Protocol Efficacies and the Differences Among the Derived Cells. *Stem Cell Rev Rep* **2022**, *18*, 94-125.10.1007/s12015-021-10258-z
56. Abdal Dayem, A.; Lee, S. B.; Kim, K.; Lim, K. M.; Jeon, T. I.; Seok, J.; Cho, A. S. Production of Mesenchymal Stem Cells Through Stem Cell Reprogramming. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*.10.3390/ijms20081922
57. Brade, T.; Pane, L. S.; Moretti, A.; Chien, K. R.; Laugwitz, K. L. Embryonic heart progenitors and cardiogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **2013**, *3*, a013847.10.1101/cshperspect.a013847
58. Hartman, M. E.; Dai, D. F.; Laflamme, M. A. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *96*, 3-17.10.1016/j.addr.2015.05.004
59. Zhao, M. T.; Shao, N. Y.; Garg, V. Subtype-specific cardiomyocytes for precision medicine: Where are we now?. *Stem Cells* **2020**, *38*, 822-833.10.1002/stem.3178
60. Liang, P.; Lan, F.; Lee, A. S.; Gong, T.; Sanchez-Freire, V.; Wang, Y.; Diecke, S.; Sallam, K.; Knowles, J. W.; Wang, P. J.; Nguyen, P. K.; Bers, D. M.; Robbins, R. C.; Wu, J. C. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* **2013**, *127*, 1677-91.10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883
61. Magdy, T.; Schuldt, A. J. T.; Wu, J. C.; Bernstein, D.; Burridge, P. W. Human Induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC)-Derived Cells to Assess Drug Cardiotoxicity: Opportunities and Problems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2018**, *58*, 83-103.10.1146/annurev-pharmtox-010617-053110
62. Bekhite, M. M.; Schulze, P. C. Human Induced Pluripotent Stem Cell as a Disease Modeling and Drug Development Platform-A Cardiac Perspective. *Cells* **2021**, *10*.10.3390/cells10123483
63. Funakoshi, S.; Yoshida, Y. Recent progress of iPSC technology in cardiac diseases. *Arch Toxicol* **2021**, *95*, 3633-3650.10.1007/s00204-021-03172-3
64. Fan, D.; Wu, H.; Pan, K.; Peng, H.; Wu, R. Regenerating Damaged Myocardium: A Review of Stem-Cell Therapies for Heart Failure. *Cells* **2021**, *10*.10.3390/cells10113125
65. Marchetto, M. C.; Winner, B.; Gage, F. H. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, R71-6.10.1093/hmg/ddq159

66. Silva, M. C.; Haggarty, S. J. Human pluripotent stem cell-derived models and drug screening in CNS precision medicine. *Ann N Y Acad Sci* **2020**, *1471*, 18-56.10.1111/nyas.14012
67. Kim, T. W.; Koo, S. Y.; Studer, L. Pluripotent Stem Cell Therapies for Parkinson Disease: Present Challenges and Future Opportunities. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 729.10.3389/fcell.2020.00729
68. Friedrich Ben-Nun, I.; Benvenisty, N. Human embryonic stem cells as a cellular model for human disorders. *Mol Cell Endocrinol* **2006**, *252*, 154-9.10.1016/j.mce.2006.03.034
69. Apati, A.; Varga, N.; Berecz, T.; Erdei, Z.; Homolya, L.; Sarkadi, B. Application of human pluripotent stem cells and pluripotent stem cell-derived cellular models for assessing drug toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15*, 61-75.10.1080/17425255.2019.1558207
70. Dolatshad, H.; Tatwavedi, D.; Ahmed, D.; Tegethoff, J. F.; Boulwood, J.; Pellagatti, A. Application of induced pluripotent stem cell technology for the investigation of hematological disorders. *Adv Biol Regul* **2019**, *71*, 19-33.10.1016/j.jbior.2018.10.001
71. Hung, S. S. C.; Khan, S.; Lo, C. Y.; Hewitt, A. W.; Wong, R. C. B. Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases. *Pharmacol Ther* **2017**, *177*, 32-43.10.1016/j.pharmthera.2017.02.026
72. Ye, L.; Ni, X.; Zhao, Z. A.; Lei, W.; Hu, S. The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiac Disease Modeling and Drug Testing. *J Cardiovasc Transl Res* **2018**, *11*, 366-374.10.1007/s12265-018-9811-3
73. Avior, Y.; Sagi, I.; Benvenisty, N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2016**, *17*, 170-82.10.1038/nrm.2015.27
74. Ben Jehuda, R.; Shemer, Y.; Binah, O. Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Rev Rep* **2018**, *14*, 323-336.10.1007/s12015-018-9811-3
75. Durand, B.; Stoetzel, C.; Schaefer, E.; Calmels, N.; Scheidecker, S.; Kempf, N.; De Melo, C.; Guilbert, A. S.; Timbolschi, D.; Donato, L.; Astruc, D.; Sauer, A.; Antal, M. C.; Dollfus, H.; El Chehadeh, S. A severe case of Frank-ter Haar syndrome and literature review: Further delineation of the phenotypical spectrum. *Eur J Med Genet* **2020**, *63*, 103857.10.1016/j.ejmg.2020.103857
76. Massadeh, S.; Alhabshan, F.; AlSudairi, H. N.; Alkwai, S.; Alsuwailm, M.; Kabbani, M. S.; Chaikhouni, F.; Alaamery, M. The Role of the Disrupted Podosome Adaptor Protein (SH3PXD2B) in Frank-Ter Haar Syndrome. *Genes (Basel)* **2022**, *13*.10.3390/genes13020236
77. Iqbal, Z.; Cejudo-Martin, P.; de Brouwer, A.; van der Zwaag, B.; Ruiz-Lozano, P.; Scimia, M. C.; Lindsey, J. D.; Weinreb, R.; Albrecht, B.; Megarbane, A.; Alanay, Y.; Ben-Neriah, Z.; Amenduni, M.; Artuso, R.; Veltman, J. A.; van Beusekom, E.; Oudakker, A.; Millan, J. L.; Hennekam, R.; Hamel, B.; Courtneidge, S. A.; van Bokhoven, H. Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *Am J Hum Genet* **2010**, *86*, 254-61.10.1016/j.ajhg.2010.01.009
78. Dean, M.; Moitra, K.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Hum Mutat* **2022**, *43*, 1162-1182.10.1002/humu.24418
79. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinnity defense system. *Physiol Rev* **2006**, *86*, 1179-236.10.1152/physrev.00037.2005
80. Apati, A.; Szebenyi, K.; Erdei, Z.; Varady, G.; Orban, T. I.; Sarkadi, B. The importance of drug transporters in human pluripotent stem cells and in early tissue differentiation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2016**, *12*, 77-92.10.1517/17425255.2016.1121382
81. Krishnamurthy, P.; Ross, D. D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K. E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B. P.; Schuetz, J. D. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 24218-25.10.1074/jbc.M313599200

82. Sarkadi, B.; Ozvegy-Laczka, C.; Nemet, K.; Varadi, A. ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* **2004**, *567*, 116-20.10.1016/j.febslet.2004.03.123
83. Zelinski, T.; Coghlan, G.; Liu, X. Q.; Reid, M. E. ABCG2 null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat Genet* **2012**, *44*, 131-2.10.1038/ng.1075
84. Saison, C.; Helias, V.; Ballif, B. A.; Peyrard, T.; Puy, H.; Miyazaki, T.; Perrot, S.; Vayssier-Taussat, M.; Waldner, M.; Le Pennec, P. Y.; Cartron, J. P.; Arnaud, L. Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nat Genet* **2012**, *44*, 174-7.10.1038/ng.1070
85. Berridge, M. J.; Lipp, P.; Bootman, M. D. The versatility and universality of calcium signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2000**, *1*, 11-21.10.1038/35036035
86. von Kugelgen, I.; Harden, T. K. Molecular pharmacology, physiology, and structure of the P2Y receptors. *Adv Pharmacol* **2011**, *61*, 373-415.10.1016/B978-0-12-385526-8.00012-6
87. Stathopoulos, P. B.; Li, G. Y.; Plevin, M. J.; Ames, J. B.; Ikura, M. Stored Ca²⁺ depletion-induced oligomerization of stromal interaction molecule 1 (STIM1) via the EF-SAM region: An initiation mechanism for capacitive Ca²⁺ entry. *J Biol Chem* **2006**, *281*, 35855-62.10.1074/jbc.M608247200
88. Philippe, R.; Antigny, F.; Buscaglia, P.; Norez, C.; Becq, F.; Frieden, M.; Mignen, O. SERCA and PMCA pumps contribute to the deregulation of Ca²⁺ homeostasis in human CF epithelial cells. *Biochim Biophys Acta* **2015**, *1853*, 892-903.10.1016/j.bbamcr.2015.01.010
89. Giladi, M.; Tal, I.; Khananshvil, D. Structural Features of Ion Transport and Allosteric Regulation in Sodium-Calcium Exchanger (NCX) Proteins. *Front Physiol* **2016**, *7*, 30.10.3389/fphys.2016.00030
90. Raingo, J.; Rebolledo, A.; Iveli, F.; Grassi de Gende, A. O.; Milesi, V. Non-selective cationic channels (NSCC) in smooth muscle cells from human umbilical arteries. *Placenta* **2004**, *25*, 723-9.10.1016/j.placenta.2004.01.028
91. Dolphin, A. C. A short history of voltage-gated calcium channels. *Br J Pharmacol* **2006**, *147 Suppl 1*, S56-62.10.1038/sj.bjp.0706442
92. Kirichok, Y.; Krapivinsky, G.; Clapham, D. E. The mitochondrial calcium uniporter is a highly selective ion channel. *Nature* **2004**, *427*, 360-4.10.1038/nature02246
93. Nicolau, S. M.; Egea, J.; Lopez, M. G.; Garcia, A. G. Mitochondrial Na⁺/Ca²⁺ exchanger, a new target for neuroprotection in rat hippocampal slices. *Biochem Biophys Res Commun* **2010**, *400*, 140-4.10.1016/j.bbrc.2010.08.028
94. Mauger, J. P. Role of the nuclear envelope in calcium signalling. *Biol Cell* **2012**, *104*, 70-83.10.1111/boc.201100103
95. Yuste, R.; Peinado, A.; Katz, L. C. Neuronal domains in developing neocortex. *Science* **1992**, *257*, 665-9.10.1126/science.1496379
96. Hussar, D. A. Drug interactions. *Clin Toxicol* **1976**, *9*, 107-18.10.3109/15563657608995412
97. Ran, C.; Chen, X. Probing the coding logic of thermosensation using spinal cord calcium imaging. *Exp Neurol* **2019**, *318*, 42-49.10.1016/j.expneurol.2019.04.009
98. Paredes, R. M.; Etzler, J. C.; Watts, L. T.; Zheng, W.; Lechleiter, J. D. Chemical calcium indicators. *Methods* **2008**, *46*, 143-51.10.1016/j.ymeth.2008.09.025
99. Apati, A.; Paszty, K.; Erdei, Z.; Szebenyi, K.; Homolya, L.; Sarkadi, B. Calcium signaling in pluripotent stem cells. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *353*, 57-67.10.1016/j.mce.2011.08.038
100. Gee, K. R.; Brown, K. A.; Chen, W. N.; Bishop-Stewart, J.; Gray, D.; Johnson, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca²⁺-indicator dyes. *Cell Calcium* **2000**, *27*, 97-106.10.1054/ceca.1999.0095
101. Thomas, D.; Tovey, S. C.; Collins, T. J.; Bootman, M. D.; Berridge, M. J.; Lipp, P. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* **2000**, *28*, 213-23.10.1054/ceca.2000.0152

102. Horikawa, K. Recent progress in the development of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *J Med Invest* **2015**, *62*, 24-8.10.2152/jmi.62.24
103. Zhang, D.; Redington, E.; Gong, Y. Rational engineering of ratiometric calcium sensors with bright green and red fluorescent proteins. *Commun Biol* **2021**, *4*, 924.10.1038/s42003-021-02452-z
104. Hendel, T.; Mank, M.; Schnell, B.; Griesbeck, O.; Borst, A.; Reiff, D. F. Fluorescence changes of genetic calcium indicators and OGB-1 correlated with neural activity and calcium in vivo and in vitro. *J Neurosci* **2008**, *28*, 7399-411.10.1523/JNEUROSCI.1038-08.2008
105. Maiter, D.; Underwood, L. E.; Martin, J. B.; Koenig, J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology* **1991**, *128*, 1100-6.10.1210/endo-128-2-1100
106. McCombs, J. E.; Palmer, A. E. Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods* **2008**, *46*, 152-9.10.1016/j.ymeth.2008.09.015
107. Tallini, Y. N.; Brekke, J. F.; Shui, B.; Doran, R.; Hwang, S. M.; Nakai, J.; Salama, G.; Segal, S. S.; Kotlikoff, M. I. Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice. *Circ Res* **2007**, *101*, 1300-9.10.1161/CIRCRESAHA.107.149484
108. Kotlikoff, M. I. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology. *J Physiol* **2007**, *578*, 55-67.10.1113/jphysiol.2006.120212
109. Badura, A.; Sun, X. R.; Giovannucci, A.; Lynch, L. A.; Wang, S. S. Fast calcium sensor proteins for monitoring neural activity. *Neurophotonics* **2014**, *1*, 025008.10.1117/1.NPh.1.2.025008
110. Chen, T. W.; Wardill, T. J.; Sun, Y.; Pulver, S. R.; Renninger, S. L.; Baohan, A.; Schreiter, E. R.; Kerr, R. A.; Orger, M. B.; Jayaraman, V.; Looger, L. L.; Svoboda, K.; Kim, D. S. Ultrasensitive fluorescent proteins for imaging neuronal activity. *Nature* **2013**, *499*, 295-300.10.1038/nature12354
111. Hao, B.; Webb, S. E.; Miller, A. L.; Yue, J. The role of Ca(2+) signaling on the self-renewal and neural differentiation of embryonic stem cells (ESCs). *Cell Calcium* **2016**, *59*, 67-74.10.1016/j.ceca.2016.01.004
112. Kashimoto, S.; Nonaka, A.; Kumazawa, T. Anesthetic influence on myocardial energy metabolism during hemorrhagic shock in rats. *Resuscitation* **1990**, *19*, 159-65.10.1016/0300-9572(90)90039-h
113. Yanagida, E.; Shoji, S.; Hirayama, Y.; Yoshikawa, F.; Otsu, K.; Uematsu, H.; Hiraoka, M.; Furuichi, T.; Kawano, S. Functional expression of Ca²⁺ signaling pathways in mouse embryonic stem cells. *Cell Calcium* **2004**, *36*, 135-46.10.1016/j.ceca.2004.01.022
114. Berecz, T.; Husveth-Toth, M.; Mioulane, M.; Merkely, B.; Apati, A.; Foldes, G. Generation and Analysis of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Endothelial Cells for High Content Screening Purposes. *Methods Mol Biol* **2020**, *2150*, 57-77.10.1007/7651_2019_222
115. Izsvak, Z.; Ivics, Z.; Plasterk, R. H. Sleeping Beauty, a wide host-range transposon vector for genetic transformation in vertebrates. *J Mol Biol* **2000**, *302*, 93-102.10.1006/jmbi.2000.4047
116. Orban, T. I.; Apati, A.; Nemeth, A.; Varga, N.; Krizsik, V.; Schamberger, A.; Szebenyi, K.; Erdei, Z.; Varady, G.; Karaszi, E.; Homolya, L.; Nemet, K.; Gocza, E.; Miskey, C.; Mates, L.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Sarkadi, B. Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells* **2009**, *27*, 1077-87.10.1002/stem.45
117. Varga, N.; Vereb, Z.; Rajnavolgyi, E.; Nemet, K.; Uher, F.; Sarkadi, B.; Apati, A. Mesenchymal stem cell like (MSCI) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *414*, 474-80.10.1016/j.bbrc.2011.09.089

118. Laszlo, L.; Maczelka, H.; Takacs, T.; Kurilla, A.; Tilajka, A.; Buday, L.; Vas, V.; Apati, A. A Novel Cell-Based Model for a Rare Disease: The Tks4-KO Human Embryonic Stem Cell Line as a Frank-Ter Haar Syndrome Model System. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*.10.3390/ijms23158803
119. Yu, D. X.; Di Giorgio, F. P.; Yao, J.; Marchetto, M. C.; Brennand, K.; Wright, R.; Mei, A.; McHenry, L.; Lisuk, D.; Grasmick, J. M.; Silberman, P.; Silberman, G.; Jappelli, R.; Gage, F. H. Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **2014**, *2*, 295-310.10.1016/j.stemcr.2014.01.009
120. Pentek, A.; Paszty, K.; Apati, A. Analysis of Intracellular Calcium Signaling in Human Embryonic Stem Cells. *Methods Mol Biol* **2016**, *1307*, 141-7.10.1007/7651_2014_68
121. Apati, A.; Paszty, K.; Hegedus, L.; Kolacsek, O.; Orban, T. I.; Erdei, Z.; Szebenyi, K.; Pentek, A.; Enyedi, A.; Sarkadi, B. Characterization of calcium signals in human embryonic stem cells and in their differentiated offspring by a stably integrated calcium indicator protein. *Cell Signal* **2013**, *25*, 752-9.10.1016/j.celsig.2012.12.024
122. Erdei, Z.; Schamberger, A.; Torok, G.; Szebenyi, K.; Varady, G.; Orban, T. I.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Apati, A. Generation of multidrug resistant human tissues by overexpression of the ABCG2 multidrug transporter in embryonic stem cells. *PLoS One* **2018**, *13*, e0194925.10.1371/journal.pone.0194925
123. Szebenyi, K.; Pentek, A.; Erdei, Z.; Varady, G.; Orban, T. I.; Sarkadi, B.; Apati, A. Efficient generation of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors based on tissue-specific enhanced green fluorescence protein expression. *Tissue Eng Part C Methods* **2015**, *21*, 35-45.10.1089/ten.TEC.2013.0646
124. Vofely, G.; Berecz, T.; Szabo, E.; Szebenyi, K.; Hathy, E.; Orban, T. I.; Sarkadi, B.; Homolya, L.; Marchetto, M. C.; Rethelyi, J. M.; Apati, A. Characterization of calcium signals in human induced pluripotent stem cell-derived dentate gyrus neuronal progenitors and mature neurons, stably expressing an advanced calcium indicator protein. *Mol Cell Neurosci* **2018**, *88*, 222-230.10.1016/j.mcn.2018.02.003
125. Ree, D.; Borsy, A.; Fothi, A.; Orban, T. I.; Varady, G.; Erdei, Z.; Sarkadi, B.; Rethelyi, J.; Varga, N.; Apati, A. Establishing a human embryonic stem cell clone with a heterozygous mutation in the DGCR8 gene. *Stem Cell Res* **2020**, *50*, 102134.10.1016/j.scr.2020.102134
126. Ree, D.; Fothi, A.; Varga, N.; Kolacsek, O.; Orban, T. I.; Apati, A. Partial Disturbance of Microprocessor Function in Human Stem Cells Carrying a Heterozygous Mutation in the DGCR8 Gene. *Genes (Basel)* **2022**, *13*.10.3390/genes13111925
127. Hathy, E.; Szabo, E.; Varga, N.; Erdei, Z.; Tordai, C.; Czehlar, B.; Baradits, M.; Jezso, B.; Koller, J.; Nagy, L.; Molnar, M. J.; Homolya, L.; Nemoda, Z.; Apati, A.; Rethelyi, J. M. Investigation of de novo mutations in a schizophrenia case-parent trio by induced pluripotent stem cell-based in vitro disease modeling: convergence of schizophrenia- and autism-related cellular phenotypes. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 504.10.1186/s13287-020-01980-5
128. Hathy, E.; Szabo, E.; Vincze, K.; Haltrich, I.; Kiss, E.; Varga, N.; Erdei, Z.; Varady, G.; Homolya, L.; Apati, A.; Rethelyi, J. M. Generation of multiple iPSC clones from a male schizophrenia patient carrying de novo mutations in genes KHSRP, LRRC7, and KIR2DL1, and his parents. *Stem Cell Res* **2021**, *51*, 102140.10.1016/j.scr.2020.102140
129. Szabo, E.; Juhasz, F.; Homolya, L.; Erdei, Z.; Apati, A. Generation of Human Neural Progenitors from Blood Samples by Interrupted Reprogramming. *Methods Mol Biol* **2022**, *2454*, 241-255.10.1007/7651_2021_386
130. Szabo, E.; Ree, D.; Jezso, B.; Vincze, K.; Foldes, G.; Molnar, A. A.; Rethelyi, J. M.; Apati, A. Generation of iPSC lines from peripheral blood mononuclear cells of identical twins both suffering from type 2 diabetes mellitus and one of them additionally diagnosed with atherosclerosis. *Stem Cell Res* **2020**, *49*, 102051.10.1016/j.scr.2020.102051

131. International Stem Cell, I.; Adewumi, O.; Aflatoonian, B.; Ahrlund-Richter, L.; Amit, M.; Andrews, P. W.; Beighton, G.; Bello, P. A.; Benvenisty, N.; Berry, L. S.; Bevan, S.; Blum, B.; Brooking, J.; Chen, K. G.; Choo, A. B.; Churchill, G. A.; Corbel, M.; Damjanov, I.; Draper, J. S.; Dvorak, P.; Emanuelsson, K.; Fleck, R. A.; Ford, A.; Gertow, K.; Gertsenstein, M.; Gokhale, P. J.; Hamilton, R. S.; Hampl, A.; Healy, L. E.; Hovatta, O.; Hyllner, J.; Imreh, M. P.; Itskovitz-Eldor, J.; Jackson, J.; Johnson, J. L.; Jones, M.; Kee, K.; King, B. L.; Knowles, B. B.; Lako, M.; Lebrin, F.; Mallon, B. S.; Manning, D.; Mayshar, Y.; McKay, R. D.; Michalska, A. E.; Mikkola, M.; Mileikovsky, M.; Minger, S. L.; Moore, H. D.; Mummery, C. L.; Nagy, A.; Nakatsuji, N.; O'Brien, C. M.; Oh, S. K.; Olsson, C.; Otonkoski, T.; Park, K. Y.; Passier, R.; Patel, H.; Patel, M.; Pedersen, R.; Pera, M. F.; Piekarczyk, M. S.; Pera, R. A.; Reubinoff, B. E.; Robins, A. J.; Rossant, J.; Rugg-Gunn, P.; Schulz, T. C.; Semb, H.; Sherrer, E. S.; Siemen, H.; Stacey, G. N.; Stojkovic, M.; Suemori, H.; Szatkiewicz, J.; Turetsky, T.; Tuuri, T.; van den Brink, S.; Vintersten, K.; Vuoristo, S.; Ward, D.; Weaver, T. A.; Young, L. A.; Zhang, W. Characterization of human embryonic stem cell lines by the International Stem Cell Initiative. *Nat Biotechnol* **2007**, *25*, 803-16.10.1038/nbt1318
132. Jaenisch, R.; Young, R. Stem cells, the molecular circuitry of pluripotency and nuclear reprogramming. *Cell* **2008**, *132*, 567-82.10.1016/j.cell.2008.01.015
133. Efthymiou, A. G.; Chen, G.; Rao, M.; Chen, G.; Boehm, M. Self-renewal and cell lineage differentiation strategies in human embryonic stem cells and induced pluripotent stem cells. *Expert Opin Biol Ther* **2014**, *14*, 1333-44.10.1517/14712598.2014.922533
134. Cowan, C. A.; Klimanskaya, I.; McMahan, J.; Atienza, J.; Witmyer, J.; Zucker, J. P.; Wang, S.; Morton, C. C.; McMahan, A. P.; Powers, D.; Melton, D. A. Derivation of embryonic stem-cell lines from human blastocysts. *N Engl J Med* **2004**, *350*, 1353-6.10.1056/NEJMSr040330
135. Zeng, H.; Park, J. W.; Guo, M.; Lin, G.; Crandall, L.; Compton, T.; Wang, X.; Li, X. J.; Chen, F. P.; Xu, R. H. Lack of ABCG2 expression and side population properties in human pluripotent stem cells. *Stem Cells* **2009**, *27*, 2435-45.10.1002/stem.192
136. Sarkadi, B.; Orban, T. I.; Szakacs, G.; Varady, G.; Schamberger, A.; Erdei, Z.; Szebenyi, K.; Homolya, L.; Apati, A. Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice?, *Stem Cells* **2010**, *28*, 174-6.10.1002/stem.262
137. Bebes, A.; Nagy, T.; Bata-Csorgo, Z.; Kemeny, L.; Dobozy, A.; Szell, M. Specific inhibition of the ABCG2 transporter could improve the efficacy of photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* **2011**, *105*, 162-6.10.1016/j.jphotobiol.2011.08.007
138. Susanto, J.; Lin, Y. H.; Chen, Y. N.; Shen, C. R.; Yan, Y. T.; Tsai, S. T.; Chen, C. H.; Shen, C. N. Porphyrin homeostasis maintained by ABCG2 regulates self-renewal of embryonic stem cells. *PLoS One* **2008**, *3*, e4023.10.1371/journal.pone.0004023
139. Ding, R.; Jin, S.; Pabon, K.; Scotto, K. W. A role for ABCG2 beyond drug transport: Regulation of autophagy. *Autophagy* **2016**, *12*, 737-51.10.1080/15548627.2016.1155009
140. Erdei, Z.; Sarkadi, B.; Brozik, A.; Szebenyi, K.; Varady, G.; Mako, V.; Pentek, A.; Orban, T. I.; Apati, A. Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response. *Eur Biophys J* **2013**, *42*, 169-79.10.1007/s00249-012-0838-0
141. Zattoni, I. F.; Delabio, L. C.; Dutra, J. P.; Kita, D. H.; Scheiffer, G.; Hemberger, M.; Pereira, G. D. S.; Moure, V. R.; Valdameri, G. Targeting breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2): Functional inhibitors and expression modulators. *Eur J Med Chem* **2022**, *237*, 114346.10.1016/j.ejmech.2022.114346
142. Barbet, R.; Peiffer, I.; Hutchins, J. R.; Hatzfeld, A.; Garrido, E.; Hatzfeld, J. A. Expression of the 49 human ATP binding cassette (ABC) genes in pluripotent embryonic stem cells and in early- and late-stage multipotent mesenchymal stem cells: possible role of ABC plasma membrane transporters in maintaining human stem cell pluripotency. *Cell Cycle* **2012**, *11*, 1611-20.10.4161/cc.20023

143. Chen, K. G.; Mallon, B. S.; Park, K.; Robey, P. G.; McKay, R. D. G.; Gottesman, M. M.; Zheng, W. Pluripotent Stem Cell Platforms for Drug Discovery. *Trends Mol Med* **2018**, *24*, 805-820.10.1016/j.molmed.2018.06.009
144. Kiss, K.; Brozik, A.; Kucsma, N.; Toth, A.; Gera, M.; Berry, L.; Vallentin, A.; Vial, H.; Vidal, M.; Szakacs, G. Shifting the paradigm: the putative mitochondrial protein ABCB6 resides in the lysosomes of cells and in the plasma membrane of erythrocytes. *PLoS One* **2012**, *7*, e37378.10.1371/journal.pone.0037378
145. Paterson, J. K.; Shukla, S.; Black, C. M.; Tachiwada, T.; Garfield, S.; Wincovitch, S.; Ernst, D. N.; Agadir, A.; Li, X.; Ambudkar, S. V.; Szakacs, G.; Akiyama, S.; Gottesman, M. M. Human ABCB6 localizes to both the outer mitochondrial membrane and the plasma membrane. *Biochemistry* **2007**, *46*, 9443-52.10.1021/bi700015m
146. Mungrue, I. N.; Zhao, P.; Yao, Y.; Meng, H.; Rau, C.; Havel, J. V.; Gorgels, T. G.; Bergen, A. A.; MacLellan, W. R.; Drake, T. A.; Bostrom, K. I.; Lusis, A. J. Abcc6 deficiency causes increased infarct size and apoptosis in a mouse cardiac ischemia-reperfusion model. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **2011**, *31*, 2806-12.10.1161/ATVBAHA.111.237420
147. Verschuere, S.; Van Gils, M.; Nollet, L.; Vanakker, O. M. From membrane to mineralization: the curious case of the ABCC6 transporter. *FEBS Lett* **2020**, *594*, 4109-4133.10.1002/1873-3468.13981
148. Brampton, C.; Aherrahrou, Z.; Chen, L. H.; Martin, L.; Bergen, A. A.; Gorgels, T. G.; Erdmann, J.; Schunkert, H.; Szabo, Z.; Varadi, A.; Le Saux, O. The level of hepatic ABCC6 expression determines the severity of calcification after cardiac injury. *Am J Pathol* **2014**, *184*, 159-70.10.1016/j.ajpath.2013.09.015
149. Orban, T. I.; Seres, L.; Ozvegy-Laczka, C.; Elkind, N. B.; Sarkadi, B.; Homolya, L. Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun* **2008**, *367*, 667-73.10.1016/j.bbrc.2007.12.172
150. Honjo, Y.; Hrycyna, C. A.; Yan, Q. W.; Medina-Perez, W. Y.; Robey, R. W.; van de Laar, A.; Litman, T.; Dean, M.; Bates, S. E. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res* **2001**, *61*, 6635-9, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11559526>
151. Ozvegy, C.; Varadi, A.; Sarkadi, B. Characterization of drug transport, ATP hydrolysis, and nucleotide trapping by the human ABCG2 multidrug transporter. Modulation of substrate specificity by a point mutation. *J Biol Chem* **2002**, *277*, 47980-90.10.1074/jbc.M207857200
152. Erdei, Z.; Lorincz, R.; Szebenyi, K.; Pentek, A.; Varga, N.; Liko, I.; Varady, G.; Szakacs, G.; Orban, T. I.; Sarkadi, B.; Apati, A. Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom* **2014**, *86*, 299-310.10.1002/cyto.b.21168
153. Nerada, Z.; Hegyi, Z.; Szepesi, A.; Toth, S.; Hegedus, C.; Varady, G.; Matula, Z.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Telbisz, A. Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. *Cytometry A* **2016**, *89*, 826-34.10.1002/cyto.a.22931
154. Telford, W. G.; Bradford, J.; Godfrey, W.; Robey, R. W.; Bates, S. E. Side population analysis using a violet-excited cell-permeable DNA binding dye. *Stem Cells* **2007**, *25*, 1029-36.10.1634/stemcells.2006-0567
155. Shah, A. N.; Gradishar, W. J. Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer: What Is Their Role?, *Oncologist* **2018**, *23*, 1153-1161.10.1634/theoncologist.2017-0672
156. Ghigo, A.; Li, M.; Hirsch, E. New signal transduction paradigms in anthracycline-induced cardiotoxicity. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1863*, 1916-25.10.1016/j.bbamcr.2016.01.021

157. McGowan, J. V.; Chung, R.; Maulik, A.; Piotrowska, I.; Walker, J. M.; Yellon, D. M. Anthracycline Chemotherapy and Cardiotoxicity. *Cardiovasc Drugs Ther* **2017**, *31*, 63-75.10.1007/s10557-016-6711-0
158. Maillet, A.; Tan, K.; Chai, X.; Sadananda, S. N.; Mehta, A.; Ooi, J.; Hayden, M. R.; Pouladi, M. A.; Ghosh, S.; Shim, W.; Brunham, L. R. Modeling Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity in Human Pluripotent Stem Cell Derived-Cardiomyocytes. *Sci Rep* **2016**, *6*, 25333.10.1038/srep25333
159. Yellamilli, A.; van Berlo, J. H. The Role of Cardiac Side Population Cells in Cardiac Regeneration. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4*, 102.10.3389/fcell.2016.00102
160. Koudstaal, S.; Jansen Of Lorkeers, S. J.; Gaetani, R.; Gho, J. M.; van Slochteren, F. J.; Sluijter, J. P.; Doevendans, P. A.; Ellison, G. M.; Chamuleau, S. A. Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2013**, *2*, 434-43.10.5966/sctm.2013-0001
161. Chan, E. M.; Ratanasirintrao, S.; Park, I. H.; Manos, P. D.; Loh, Y. H.; Huo, H.; Miller, J. D.; Hartung, O.; Rho, J.; Ince, T. A.; Daley, G. Q.; Schlaeger, T. M. Live cell imaging distinguishes bona fide human iPS cells from partially reprogrammed cells. *Nat Biotechnol* **2009**, *27*, 1033-7.10.1038/nbt.1580
162. Kukul, S.; Guin, D.; Rawat, C.; Bora, S.; Mishra, M. K.; Sharma, P.; Paul, P. R.; Kanojia, N.; Grewal, G. K.; Kukreti, S.; Saso, L.; Kukreti, R. Multidrug efflux transporter ABCG2: expression and regulation. *Cell Mol Life Sci* **2021**, *78*, 6887-6939.10.1007/s00018-021-03901-y
163. Padmanabhan, R.; Chen, K. G.; Gillet, J. P.; Handley, M.; Mallon, B. S.; Hamilton, R. S.; Park, K.; Varma, S.; Mehaffey, M. G.; Robey, P. G.; McKay, R. D.; Gottesman, M. M. Regulation and expression of the ATP-binding cassette transporter ABCG2 in human embryonic stem cells. *Stem Cells* **2012**, *30*, 2175-87.10.1002/stem.1195
164. Singh, U.; Quintanilla, R. H.; Grecian, S.; Gee, K. R.; Rao, M. S.; Lakshmiopathy, U. Novel live alkaline phosphatase substrate for identification of pluripotent stem cells. *Stem Cell Rev Rep* **2012**, *8*, 1021-9.10.1007/s12015-012-9359-6
165. Eustaquio Do Imperio, G.; Lye, P.; Bloise, E.; Matthews, S. G. Function of Multidrug Resistance Transporters is Disrupted by Infection Mimics in Human Brain Endothelial Cells. *Tissue Barriers* **2021**, *9*, 1860616.10.1080/21688370.2020.1860616
166. Gorczyca, L.; Aleksunes, L. M. Transcription factor-mediated regulation of the BCRP/ABCG2 efflux transporter: a review across tissues and species. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2020**, *16*, 239-253.10.1080/17425255.2020.1732348
167. Kovacsics, D.; Brozik, A.; Tihanyi, B.; Matula, Z.; Borsy, A.; Meszaros, N.; Szabo, E.; Nemeth, E.; Fothi, A.; Zambo, B.; Szuts, D.; Varady, G.; Orban, T. I.; Apati, A.; Sarkadi, B. Precision-engineered reporter cell lines reveal ABCG2 regulation in live lung cancer cells. *Biochem Pharmacol* **2020**, *175*, 113865.10.1016/j.bcp.2020.113865
168. Apati, A.; Orban, T. I.; Varga, N.; Nemeth, A.; Schamberger, A.; Krizsik, V.; Erdelyi-Belle, B.; Homolya, L.; Varady, G.; Padanyi, R.; Karaszi, E.; Kemna, E. W.; Nemet, K.; Sarkadi, B. High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta* **2008**, *1778*, 2700-9.10.1016/j.bbamem.2008.08.010
169. Sandor, S.; Jordanidisz, T.; Schamberger, A.; Varady, G.; Erdei, Z.; Apati, A.; Sarkadi, B.; Orban, T. I. Functional characterization of the ABCG2 5' non-coding exon variants: Stem cell specificity, translation efficiency and the influence of drug selection. *Biochim Biophys Acta* **2016**, *1859*, 943-51.10.1016/j.bbagr.2016.05.007
170. Berecz, T.; Yiu, A.; Vittay, O.; Orsolits, B.; Mioulane, M.; Dos Remedios, C. G.; Ketteler, R.; Merkely, B.; Apati, A.; Harding, S. E.; Hellen, N.; Foldes, G. Transcriptional co-activators YAP1-TAZ of Hippo signalling in doxorubicin-induced cardiomyopathy. *ESC Heart Fail* **2022**, *9*, 224-235.10.1002/ehf2.13756

171. Mamo, S.; Kobolak, J.; Borbiro, I.; Biro, T.; Bock, I.; Dinnyes, A. Gene targeting and Calcium handling efficiencies in mouse embryonic stem cell lines. *World J Stem Cells* **2010**, *2*, 127-40.10.4252/wjsc.v2.i6.127
172. Schwirtlich, M.; Emri, Z.; Antal, K.; Mate, Z.; Katarova, Z.; Szabo, G. GABA(A) and GABA(B) receptors of distinct properties affect oppositely the proliferation of mouse embryonic stem cells through synergistic elevation of intracellular Ca(2+). *FASEB J* **2010**, *24*, 1218-28.10.1096/fj.09-143586
173. Todorova, M. G.; Fuentes, E.; Soria, B.; Nadal, A.; Quesada, I. Lysophosphatidic acid induces Ca²⁺ mobilization and c-Myc expression in mouse embryonic stem cells via the phospholipase C pathway. *Cell Signal* **2009**, *21*, 523-8.10.1016/j.cellsig.2008.12.005
174. Malmersjo, S.; Liste, I.; Dyachok, O.; Tengholm, A.; Arenas, E.; Uhlen, P. Ca²⁺ and cAMP signaling in human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *Stem Cells Dev* **2010**, *19*, 1355-64.10.1089/scd.2009.0436
175. Fukushima, N.; Ishii, I.; Contos, J. J.; Weiner, J. A.; Chun, J. Lysophospholipid receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2001**, *41*, 507-34.10.1146/annurev.pharmtox.41.1.507
176. Traynelis, S. F.; Trejo, J. Protease-activated receptor signaling: new roles and regulatory mechanisms. *Curr Opin Hematol* **2007**, *14*, 230-5.10.1097/MOH.0b013e3280dce568
177. Jones, B. L.; Kearns, G. L. Histamine: new thoughts about a familiar mediator. *Clin Pharmacol Ther* **2011**, *89*, 189-97.10.1038/clpt.2010.256
178. Smit, M. J.; Hoffmann, M.; Timmerman, H.; Leurs, R. Molecular properties and signalling pathways of the histamine H1 receptor. *Clin Exp Allergy* **1999**, *29 Suppl 3*, 19-28, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10444208>
179. Higuchi, S.; Ohtsu, H.; Suzuki, H.; Shirai, H.; Frank, G. D.; Eguchi, S. Angiotensin II signal transduction through the AT1 receptor: novel insights into mechanisms and pathophysiology. *Clin Sci (Lond)* **2007**, *112*, 417-28.10.1042/CS20060342
180. Putney, J. W. Forms and functions of store-operated calcium entry mediators, STIM and Orai. *Adv Biol Regul* **2018**, *68*, 88-96.10.1016/j.jbior.2017.11.006
181. Ermakov, A.; Daks, A.; Fedorova, O.; Shuvalov, O.; Barlev, N. A. Ca(2+) -depended signaling pathways regulate self-renewal and pluripotency of stem cells. *Cell Biol Int* **2018**, *42*, 1086-1096.10.1002/cbin.10998
182. Ermakov, A.; Pells, S.; Freile, P.; Ganeva, V. V.; Wildenhain, J.; Bradley, M.; Pawson, A.; Millar, R.; De Sousa, P. A. A role for intracellular calcium downstream of G-protein signaling in undifferentiated human embryonic stem cell culture. *Stem Cell Res* **2012**, *9*, 171-84.10.1016/j.scr.2012.06.007
183. Huang, J.; Zhang, M.; Zhang, P.; Liang, H.; Ouyang, K.; Yang, H. T. Coupling switch of P2Y-IP3 receptors mediates differential Ca(2+) signaling in human embryonic stem cells and derived cardiovascular progenitor cells. *Purinergic Signal* **2016**, *12*, 465-78.10.1007/s11302-016-9512-9
184. Huang, J. J.; Wang, Y. J.; Zhang, M.; Zhang, P.; Liang, H.; Bai, H. J.; Yu, X. J.; Yang, H. T. Functional expression of the Ca(2+) signaling machinery in human embryonic stem cells. *Acta Pharmacol Sin* **2017**, *38*, 1663-1672.10.1038/aps.2017.29
185. Paliwal, S.; Fiumera, H. L.; Mohanty, S. Stem cell plasticity and regenerative potential regulation through Ca(2+)-mediated mitochondrial nuclear crosstalk. *Mitochondrion* **2021**, *56*, 1-14.10.1016/j.mito.2020.10.002
186. Shimba, K.; Iida, S.; Kotani, K.; Jimbo, Y. Cell-cycle-dependent Ca(2+) transients in human induced pluripotent stem cells revealed by a simultaneous imaging of cell nuclei and intracellular Ca(2+) level. *Integr Biol (Camb)* **2016**, *8*, 985-990.10.1039/c6ib00074f

187. Talmon, M.; Massara, E.; Pruonto, G.; Quaregna, M.; Boccafoschi, F.; Riva, B.; Fresu, L. G. Characterization of a functional Ca(2+) toolkit in urine-derived stem cells and derived skeletal muscle cells. *Cell Calcium* **2022**, *103*, 102548.10.1016/j.ceca.2022.102548
188. Apati, A.; Berecz, T.; Sarkadi, B. Calcium signaling in human pluripotent stem cells. *Cell Calcium* **2016**, *59*, 117-23.10.1016/j.ceca.2016.01.005
189. Li, S.; Chen, G.; Li, R. A. Calcium signalling of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Physiol* **2013**, *591*, 5279-90.10.1113/jphysiol.2013.256495
190. Tonelli, F. M.; Santos, A. K.; Gomes, D. A.; da Silva, S. L.; Gomes, K. N.; Ladeira, L. O.; Resende, R. R. Stem cells and calcium signaling. *Adv Exp Med Biol* **2012**, *740*, 891-916.10.1007/978-94-007-2888-2_40
191. Burridge, P. W.; Matsa, E.; Shukla, P.; Lin, Z. C.; Churko, J. M.; Ebert, A. D.; Lan, F.; Diecke, S.; Huber, B.; Mordwinkin, N. M.; Plews, J. R.; Abilez, O. J.; Cui, B.; Gold, J. D.; Wu, J. C. Chemically defined generation of human cardiomyocytes. *Nat Methods* **2014**, *11*, 855-60.10.1038/nmeth.2999
192. Prasain, N.; Lee, M. R.; Vemula, S.; Meador, J. L.; Yoshimoto, M.; Ferkowicz, M. J.; Fett, A.; Gupta, M.; Rapp, B. M.; Saadatzadeh, M. R.; Ginsberg, M.; Elemento, O.; Lee, Y.; Voytik-Harbin, S. L.; Chung, H. M.; Hong, K. S.; Reid, E.; O'Neill, C. L.; Medina, R. J.; Stitt, A. W.; Murphy, M. P.; Rafii, S.; Broxmeyer, H. E.; Yoder, M. C. Differentiation of human pluripotent stem cells to cells similar to cord-blood endothelial colony-forming cells. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 1151-1157.10.1038/nbt.3048
193. Tan, Y.; Han, P.; Gu, Q.; Chen, G.; Wang, L.; Ma, R.; Wu, J.; Feng, C.; Zhang, Y.; Wang, L.; Hu, B.; Li, W.; Hao, J.; Zhou, Q. Generation of clinical-grade functional cardiomyocytes from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *J Tissue Eng Regen Med* **2018**, *12*, 153-163.10.1002/term.2381
194. Gisone, I.; Cecchetti, A.; Ceccherini, E.; Persiani, E.; Morales, M. A.; Vozzi, F. Cardiac tissue engineering: Multiple approaches and potential applications. *Front Bioeng Biotechnol* **2022**, *10*, 980393.10.3389/fbioe.2022.980393
195. Matsa, E.; Denning, C. In vitro uses of human pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes. *J Cardiovasc Transl Res* **2012**, *5*, 581-92.10.1007/s12265-012-9376-5
196. Onodi, Z.; Visnovitz, T.; Kiss, B.; Hambalko, S.; Koncz, A.; Agg, B.; Varadi, B.; Toth, V. E.; Nagy, R. N.; Gergely, T. G.; Gergo, D.; Makkos, A.; Pelyhe, C.; Varga, N.; Ree, D.; Apati, A.; Leszek, P.; Kovacs, T.; Nagy, N.; Ferdinandy, P.; Buzas, E. I.; Gorbe, A.; Giricz, Z.; Varga, Z. V. Systematic transcriptomic and phenotypic characterization of human and murine cardiac myocyte cell lines and primary cardiomyocytes reveals serious limitations and low resemblances to adult cardiac phenotype. *J Mol Cell Cardiol* **2022**, *165*, 19-30.10.1016/j.yjmcc.2021.12.007
197. Berridge, M. J. Neuronal calcium signaling. *Neuron* **1998**, *21*, 13-26.10.1016/s0896-6273(00)80510-3
198. Lucassen, P. J.; Toni, N.; Kempermann, G.; Frisen, J.; Gage, F. H.; Swaab, D. F. Limits to human neurogenesis-really?, *Mol Psychiatry* **2020**, *25*, 2207-2209.10.1038/s41380-018-0337-5
199. Anand, K. S.; Dhikav, V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* **2012**, *15*, 239-46.10.4103/0972-2327.104323
200. Fritsche, E.; Haarmann-Stemmann, T.; Kapr, J.; Galanjuk, S.; Hartmann, J.; Mertens, P. R.; Kampfer, A. A. M.; Schins, R. P. F.; Tigges, J.; Koch, K. Stem Cells for Next Level Toxicity Testing in the 21st Century. *Small* **2021**, *17*, e2006252.10.1002/sml.202006252
201. Galiakberova, A. A.; Surin, A. M.; Bakaeva, Z. V.; Sharipov, R. R.; Zhang, D.; Dorovskoy, D. A.; Shakirova, K. M.; Fisenko, A. P.; Dashinimaev, E. B. iPSC-Derived Human Neurons with GCaMP6s Expression Allow In Vitro Study of Neurophysiological Responses to Neurochemicals. *Neurochem Res* **2022**, *47*, 952-966.10.1007/s11064-021-03497-6

202. Lidgerwood, G. E.; Pitson, S. M.; Bonder, C.; Pebay, A. Roles of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in stem cell biology. *Prog Lipid Res* **2018**, *72*, 42-54.10.1016/j.plipres.2018.09.001
203. Gage, F. H.; Temple, S. Neural stem cells: generating and regenerating the brain. *Neuron* **2013**, *80*, 588-601.10.1016/j.neuron.2013.10.037
204. Suzuki, I. K.; Vanderhaeghen, P. Is this a brain which I see before me? Modeling human neural development with pluripotent stem cells. *Development* **2015**, *142*, 3138-50.10.1242/dev.120568
205. Imaizumi, K.; Okano, H. Modeling neurodevelopment in a dish with pluripotent stem cells. *Dev Growth Differ* **2021**, *63*, 18-25.10.1111/dgd.12699
206. LaMarca, E. A.; Powell, S. K.; Akbarian, S.; Brennand, K. J. Modeling Neuropsychiatric and Neurodegenerative Diseases With Induced Pluripotent Stem Cells. *Front Pediatr* **2018**, *6*, 82.10.3389/fped.2018.00082
207. Garcia-Leon, J. A.; Vitorica, J.; Gutierrez, A. Use of human pluripotent stem cell-derived cells for neurodegenerative disease modeling and drug screening platform. *Future Med Chem* **2019**, *11*, 1305-1322.10.4155/fmc-2018-0520
208. Limone, F.; Klim, J. R.; Mordes, D. A. Pluripotent stem cell strategies for rebuilding the human brain. *Front Aging Neurosci* **2022**, *14*, 1017299.10.3389/fnagi.2022.1017299
209. Gordon, A.; Yoon, S. J.; Tran, S. S.; Makinson, C. D.; Park, J. Y.; Andersen, J.; Valencia, A. M.; Horvath, S.; Xiao, X.; Huguenard, J. R.; Pasca, S. P.; Geschwind, D. H. Long-term maturation of human cortical organoids matches key early postnatal transitions. *Nat Neurosci* **2021**, *24*, 331-342.10.1038/s41593-021-00802-y
210. Pasca, S. P. The rise of three-dimensional human brain cultures. *Nature* **2018**, *553*, 437-445.10.1038/nature25032
211. Szabo, E.; Juhasz, F.; Hathy, E.; Ree, D.; Homolya, L.; Erdei, Z.; Rethelyi, J. M.; Apati, A. Functional Comparison of Blood-Derived Human Neural Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.10.3390/ijms21239118
212. Bacskai, I.; Mazlo, A.; Kis-Toth, K.; Szabo, A.; Panyi, G.; Sarkadi, B.; Apati, A.; Rajnavolgyi, E. Mesenchymal Stromal Cell-Like Cells Set the Balance of Stimulatory and Inhibitory Signals in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev* **2015**, *24*, 1805-16.10.1089/scd.2014.0509
213. Paloczi, J.; Varga, Z. V.; Apati, A.; Szebenyi, K.; Sarkadi, B.; Madonna, R.; De Caterina, R.; Csont, T.; Eschenhagen, T.; Ferdinandy, P.; Gorbe, A. Exogenous Nitric Oxide Protects Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes against Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 4298945.10.1155/2016/4298945
214. Lilienberg, J.; Hegyi, Z.; Szabo, E.; Hathy, E.; Malnasi-Csizmadia, A.; Rethelyi, J. M.; Apati, A.; Homolya, L. Pharmacological Modulation of Neurite Outgrowth in Human Neural Progenitor Cells by Inhibiting Non-muscle Myosin II. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 719636.10.3389/fcell.2021.719636
215. Erdelyi-Belle, B.; Torok, G.; Apati, A.; Sarkadi, B.; Schaff, Z.; Kiss, A.; Homolya, L. Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *Pathol Oncol Res* **2015**, *21*, 1059-70.10.1007/s12253-015-9936-5
216. Torok, G.; Erdei, Z.; Lilienberg, J.; Apati, A.; Homolya, L. The importance of transporters and cell polarization for the evaluation of human stem cell-derived hepatic cells. *PLoS One* **2020**, *15*, e0227751.10.1371/journal.pone.0227751
217. Cheng, L.; Hammond, H.; Ye, Z.; Zhan, X.; Dravid, G. Human adult marrow cells support prolonged expansion of human embryonic stem cells in culture. *Stem Cells* **2003**, *21*, 131-42.10.1634/stemcells.21-2-131

218. Cho, M.; Lee, E. J.; Nam, H.; Yang, J. H.; Cho, J.; Lim, J. M.; Lee, G. Human feeder layer system derived from umbilical cord stromal cells for human embryonic stem cells. *Fertil Steril* **2010**, *93*, 2525-31.10.1016/j.fertnstert.2010.03.027
219. Cobo, F.; Navarro, J. M.; Herrera, M. I.; Vivo, A.; Porcel, D.; Hernandez, C.; Jurado, M.; Garcia-Castro, J.; Menendez, P. Electron microscopy reveals the presence of viruses in mouse embryonic fibroblasts but neither in human embryonic fibroblasts nor in human mesenchymal cells used for hESC maintenance: toward an implementation of microbiological quality assurance program in stem cell banks. *Cloning Stem Cells* **2008**, *10*, 65-74.10.1089/clo.2007.0020
220. Amit, M.; Itskovitz-Eldor, J. Embryonic stem cells: isolation, characterization and culture. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **2009**, *114*, 173-84.10.1007/10_2008_20
221. Hoogduijn, M. J.; Popp, F.; Verbeek, R.; Masoodi, M.; Nicolaou, A.; Baan, C.; Dahlke, M. H. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol* **2010**, *10*, 1496-500.10.1016/j.intimp.2010.06.019
222. Le Blanc, K.; Tammik, L.; Sundberg, B.; Haynesworth, S. E.; Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **2003**, *57*, 11-20.10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x
223. Barberi, T.; Willis, L. M.; Socci, N. D.; Studer, L. Derivation of multipotent mesenchymal precursors from human embryonic stem cells. *PLoS Med* **2005**, *2*, e161.10.1371/journal.pmed.0020161
224. Trivedi, P.; Hematti, P. Derivation and immunological characterization of mesenchymal stromal cells from human embryonic stem cells. *Exp Hematol* **2008**, *36*, 350-9.10.1016/j.exphem.2007.10.007
225. Hwang, N. S.; Varghese, S.; Lee, H. J.; Zhang, Z.; Ye, Z.; Bae, J.; Cheng, L.; Elisseeff, J. In vivo commitment and functional tissue regeneration using human embryonic stem cell-derived mesenchymal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2008**, *105*, 20641-6.10.1073/pnas.0809680106
226. Tan, Z.; Su, Z. Y.; Wu, R. R.; Gu, B.; Liu, Y. K.; Zhao, X. L.; Zhang, M. Immunomodulative effects of mesenchymal stem cells derived from human embryonic stem cells in vivo and in vitro. *J Zhejiang Univ Sci B* **2011**, *12*, 18-27.10.1631/jzus.B1000074
227. Liu, Y. P.; Hematti, P. Generation of mesenchymal stromal cells from HOXB4-expressing human embryonic stem cells. *Cytotherapy* **2009**, *11*, 716-25.10.3109/14653240903051566
228. Mazlo, A.; Kovacs, R.; Miltner, N.; Toth, M.; Vereb, Z.; Szabo, K.; Bacskai, I.; Pazmandi, K.; Apati, A.; Biro, T.; Bene, K.; Rajnavolgyi, E.; Bacsi, A. MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-/IL-10-producing T cells via CTLA-4. *iScience* **2021**, *24*, 102312.10.1016/j.isci.2021.102312
229. Keshavarz Shahbaz, S.; Mansourabadi, A. H.; Jafari, D. Genetically engineered mesenchymal stromal cells as a new trend for treatment of severe acute graft-versus-host disease. *Clin Exp Immunol* **2022**, *208*, 12-24.10.1093/cei/uxac016
230. Anoop, M.; Datta, I. Stem Cells Derived from Human Exfoliated Deciduous Teeth (SHED) in Neuronal Disorders: A Review. *Curr Stem Cell Res Ther* **2021**, *16*, 535-550.10.2174/1574888X16666201221151512
231. Liao, S.; Zhang, Y.; Ting, S.; Zhen, Z.; Luo, F.; Zhu, Z.; Jiang, Y.; Sun, S.; Lai, W. H.; Lian, Q.; Tse, H. F. Potent immunomodulation and angiogenic effects of mesenchymal stem cells versus cardiomyocytes derived from pluripotent stem cells for treatment of heart failure. *Stem Cell Res Ther* **2019**, *10*, 78.10.1186/s13287-019-1183-3
232. Mardpour, S.; Hassani, S. N.; Mardpour, S.; Sayahpour, F.; Vosough, M.; Ai, J.; Aghdami, N.; Hamidieh, A. A.; Baharvand, H. Extracellular vesicles derived from human embryonic stem cell-MSCs ameliorate cirrhosis in thioacetamide-induced chronic liver injury. *J Cell Physiol* **2018**, *233*, 9330-9344.10.1002/jcp.26413

233. Zheng, Q.; Zhang, S.; Guo, W. Z.; Li, X. K. The Unique Immunomodulatory Properties of MSC-Derived Exosomes in Organ Transplantation. *Front Immunol* **2021**, *12*, 659621.10.3389/fimmu.2021.659621
234. Paprocka, M.; Kraskiewicz, H.; Bielawska-Pohl, A.; Krawczyński, A.; Masłowski, L.; Czyżewska-Buczynska, A.; Witkiewicz, W.; Dus, D.; Czarnecka, A. From Primary MSC Culture of Adipose Tissue to Immortalized Cell Line Producing Cytokines for Potential Use in Regenerative Medicine Therapy or Immunotherapy. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*.10.3390/ijms222111439
235. Khalid, A. B.; Pence, J.; Suthon, S.; Lin, J.; Miranda-Carboni, G. A.; Krum, S. A. GATA4 regulates mesenchymal stem cells via direct transcriptional regulation of the WNT signalosome. *Bone* **2021**, *144*, 115819.10.1016/j.bone.2020.115819
236. Rivera-Perez, J. A.; Wakamiya, M.; Behringer, R. R. Goosecoid acts cell autonomously in mesenchyme-derived tissues during craniofacial development. *Development* **1999**, *126*, 3811-21.10.1242/dev.126.17.3811
237. Eastham, A. M.; Spencer, H.; Soncin, F.; Ritson, S.; Merry, C. L.; Stern, P. L.; Ward, C. M. Epithelial-mesenchymal transition events during human embryonic stem cell differentiation. *Cancer Res* **2007**, *67*, 11254-62.10.1158/0008-5472.CAN-07-2253
238. Farr, C. V.; El-Kasaby, A.; Freissmuth, M.; Sucic, S. The Creatine Transporter Unfolded: A Knotty Premise in the Cerebral Creatine Deficiency Syndrome. *Front Synaptic Neurosci* **2020**, *12*, 588954.10.3389/fnsyn.2020.588954
239. Powell, S. K.; O'Shea, C. P.; Shannon, S. R.; Akbarian, S.; Brennand, K. J. Investigation of Schizophrenia with Human Induced Pluripotent Stem Cells. *Adv Neurobiol* **2020**, *25*, 155-206.10.1007/978-3-030-45493-7_6
240. Cirillo, E.; Giardino, G.; Gallo, V.; Puliafito, P.; Azzari, C.; Bacchetta, R.; Cardinale, F.; Cicalese, M. P.; Consolini, R.; Martino, S.; Martire, B.; Molinatto, C.; Plebani, A.; Scarano, G.; Soresina, A.; Cancrini, C.; Rossi, P.; Digilio, M. C.; Pignata, C. Intergenerational and intrafamilial phenotypic variability in 22q11.2 deletion syndrome subjects. *BMC Med Genet* **2014**, *15*, 1.10.1186/1471-2350-15-1
241. McDonald-McGinn, D. M.; Sullivan, K. E.; Marino, B.; Philip, N.; Swillen, A.; Vorstman, J. A.; Zackai, E. H.; Emanuel, B. S.; Vermeesch, J. R.; Morrow, B. E.; Scambler, P. J.; Bassett, A. S. 22q11.2 deletion syndrome. *Nat Rev Dis Primers* **2015**, *1*, 15071.10.1038/nrdp.2015.71
242. Matos, M. R.; Ho, S. M.; Schrode, N.; Brennand, K. J. Integration of CRISPR-engineering and hiPSC-based models of psychiatric genomics. *Mol Cell Neurosci* **2020**, *107*, 103532.10.1016/j.mcn.2020.103532

11. A DOLGOZAT ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK EREDETI VERZIÓI

(A különlenyomatok a 3. adatlaphoz csatolva találhatók.)

1. Kiegészítő táblázat *Az ABC fehérjék típusainak összefoglaló táblázata*

ABC protein (Gene symbol)	Function – potential substrates	Localization (protein)	Tissue distribution
ABCA1	HDL biogenesis -glycero-phospholipid compounds	PM/Golgi/lyso	Broad
ABCA2	Control of lipid transport - unknown	PM/Golgi/lyso	Brain- Broad
ABCA3	Lung surfactant production- glycero-phospholipid compounds	PM/Lysosome	Lung- Broad
ABCA4	Retinal integrity- glycero-phospholipid compounds	PM	Retina
ABCA5	Control of lipid transport - unknown	Endolysosome	Broad -Heart?
ABCA6	Control of lipid transport - unknown	PM	Broad
ABCA7	Phagocytosis (?) -glycero-phospholipid compounds/ceramide backbone lipids	PM	Broad
ABCA8	Control of lipid transport - unknown	PM	Broad
ABCA9	Control of lipid transport - unknown	PM	Broad
ABCA10	Control of lipid transport - unknown	PM	Broad
ABCA12	Skin lipid barrier formation- ceramide backbone lipids	PM	Keratinocytes/skin
ABCA13	Control of lipid transport - unknown	PM	Broad
ABCB1 (MDR1)	Multidrug resistance - drugs and metabolites	PM	Tissue barriers- Broad-cancer
ABCB2 (TAP1)	Antigen presentation - peptide	ER	Blood
ABCB3 (TAP2)	Antigen presentation - peptide	ER	Blood
ABCB4	Phospholipid flippase - lipids	PM	Liver canaliculus
ABCB5	Multidrug resistance - drugs	PM	Broad-melanomas
ABCB6	Heme and porphyrin transport?	Mito/lyso/PM?	Broad
ABCB7	Metal homeostasis - heme	Mitochondria	Broad
ABCB8	Mitochondrial iron homeostasis - unknown	Mitochondria	Broad
ABCB9	Antigen presentation-peptide?	Lysosomal	Testis-broad
ABCB10	Mitochondrial transport functions related to heme biosynthesis?	Mitochondria	Broad
ABCC1 (MRP1)	Multidrug resistance-drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Tissue barriers – broad - cancer
ABCC2	Multidrug resistance - drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Broad-liver
ABCC3	Multidrug resistance - drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Broad
ABCC4	Multidrug resistance - drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Broad
ABCC5	Multidrug resistance - drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Broad
ABCC6	Tissue metabolism metabolites/ organic anions	PM	liver, broad
ABCC7 (CFTR)	Cystic fibrosis - chloride ion channel	PM	Ephitelial cells
ABCC8 (SUR1)	Sulfonylurea receptor – potassium channel	PM	Pancreas
ABCC9 (SUR2)	Sulfonylurea receptor – potassium channel	PM	Smooth/cardiac muscle
ABCC10	Multidrug resistance - drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Broad
ABCC11	Multidrug resistance - drugs/ metabolites/ organic anions	PM	Broad - liver
ABCC12	Multidrug resistance - drugs/ metabolites	PM	Broad
ABCD1	acyl-CoA ester transporter?	Peroxisome	Broad
ABCD2	Long chain fatty acids? - unknown	Peroxisome	Broad
ABCD3	Long chain fatty acids? - unknown	Peroxisome	Broad
ABCD4	Long chain fatty acids? - unknown	Peroxisome	Broad
ABCE1*	<i>RNase L inhibitor</i>	<i>Cytoplasm</i>	<i>Broad</i>
ABCF1*	<i>Translation initiation/Inflammation</i>	<i>Cytoplasm</i>	<i>Broad</i>
ABCF2*	<i>Inflammation?</i>	<i>Cytoplasm</i>	<i>Broad</i>
ABCF3*	<i>Inflammation?</i>	<i>Cytoplasm</i>	<i>Broad</i>
ABCG1	Lipid homeostasis	PM	Broad /macrophage
ABCG2	Multidrug resistance - drugs/ metabolites	PM	Tissue barriers-stem cells-cancer
ABCG5	Sterol transporter	PM	Liver/colon/intestine
ABCG8	Sterol transporter	PM	Liver/colon/intestine

* no membrane domain, not a transporter, Cyto-Cytoplasm, Lyso-Lysosome, Mito-Mitochondria, PM- plasmamembrane