

VÁLASZ

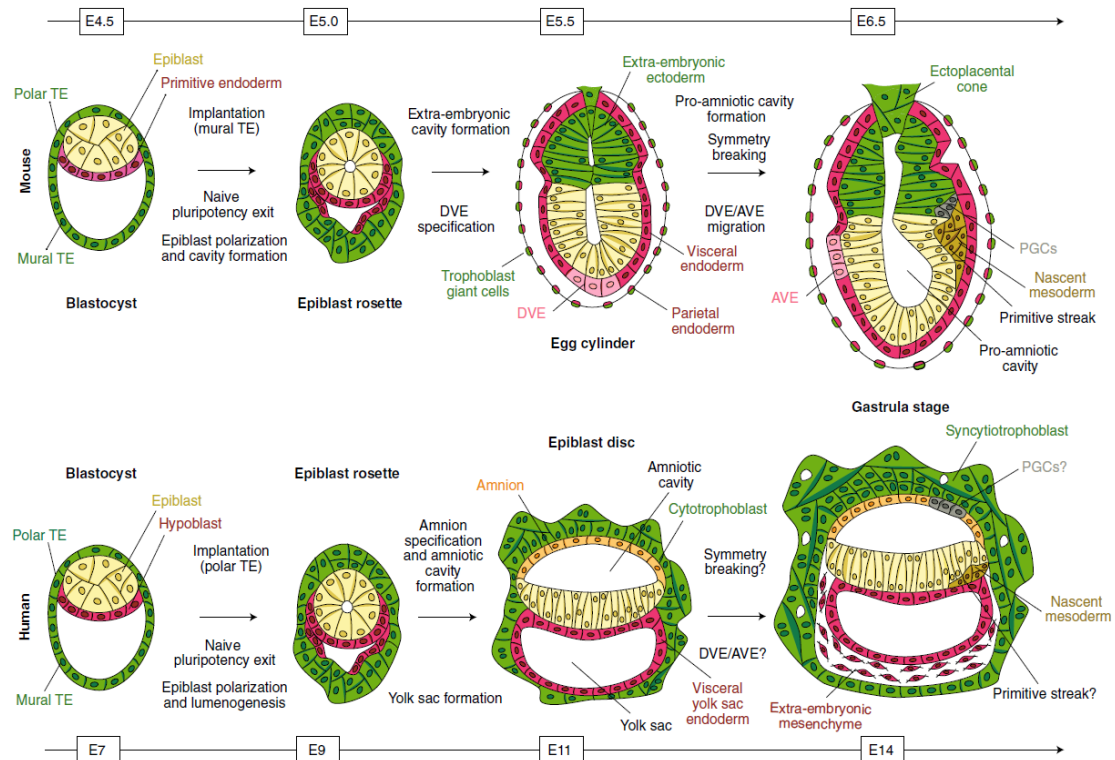
Dr. Nagy Nándor opponens véleményére

Szeretném megköszönni Dr. Nagy Nándor opponensnek, hogy elvállalta MTA Doktori értekezésem bírálatát. Köszönöm a minden részletre kiterjedő és alapos bírálatot, valamint a méltató szavakat. Munkám célja a kezdetektől az volt, hogy hozzájáruljon a hatékonyabb és alkalmazhatóbb transzlációhoz a pluripotencia tulajdonság jobb megismerése által. A dolgozatban bemutatott őssejtmodellek, akár egér, akár nyúl, szarvasmarha, sertés vagy éppen humán eredetűek, mind-mind egy-egy építőkövet jelentenek e folyamatban, és gazdagítják tudásunkat az őssejtekről, amely segítheti szélesebb körű és biztonságos alkalmazásuk minél előbbi elérését a regeneratív medicina egyes területein.

Kérdéseire és felvetéseire az alábbiakban válaszolok.

- 1) 10. oldal. Az 1. ábrához hasonlóan jó lett volna, ha van egy olyan sémás rajz is, ahol az ERSE és APE sejtek is illusztrálva vannak. Van-e arra adat, hogy humán embryóban is pluripotens tulajdonság jellemzi az epiblaszt sejtréteget?**

Köszönöm, hogy felhívta a figyelmet erre a hiányosságra. A 10. oldal 1. ábra az egér embrionális fejlődés sematikus rajza, az egyes embrióstádiumokat mutatja be a petesejt megtermékenyülésétől a 6.5 embrionális napig (E6.5). Habár az ábra után következő bekezdés tárgyalja az ERSE és APE stádiumot, azonban ez valóban nem került feltüntetésre az 1. ábrán. Az ERSE stádium, vagyis a radiális szimmetrikus epiblaszt stádium az egér embrionális fejlődés során az epiblaszt sugár irányú szimmetriájára utal, amely a gasztruláció kezdete előtt figyelhető meg. Ez a szimmetria azonban a gasztruláció során felbomlik, és kialakulnak a test tengelyei (elülső-hátsó, hát-has, bal-jobb). Az ábrán tehát a posztimplantációs epiblaszt mellé kellett volna írni az ERSE stádium megjelölést az E5.5 fejlődési stádiumban. Az APE stádium megjelölést, vagyis az anterior-poszterior epiblaszt kialakulásáról pedig a következő E6.5 stádiumnál kellett volna jelölni, valamint az E7.5 stádiumot is érdemes lett volna még feltüntetni. Ugyanakkor itt szükséges megjegyezni, hogy az egyes fajok között jelentős eltérés figyelhető meg, amellyel kapcsolatban a dolgozat 4.4 fejezetében a *„Haszonállatok embrióinak összehasonlítása, új pluripotencia gének azonosítása”* című fejezetben mutatok be eredményeket. Ott a 19. ábrán is bemutatásra kerül, hogy az egyik első és igen jelentős kihívás a pluripotens sejtpopulációk leírásában a különböző embrionális fejlődési stádiumok egymásnak való megfeleltetése, amely az egyes fajok a gasztrulációt megelőző eltérő epiblaszt morfogenezisére vezethető vissza (Sheng, 2015). E tekintetben szeretnék bemutatni egy ábrát Shahbazi és Zernicka-Goetz 2018-as publikációjából, amelynek 2. ábrája az egér és humán embriók fejlődésének e korai stádiumát hasonlítja össze (Shahbazi and Zernicka-Goetz, 2018). A Cambridge Egyetem kutatói által készített sematikus ábrán „epiblaszt rozettaként” látjuk a sugárirányban szimmetrikus epiblasztot (E5.0) majd az ún. „egg cylinder” stádiumot (E5.5) amelynek megnyúlásával kezdődik az embrionális tengelyek kialakulása, az APE epiblaszt stádium. Az ábra alsó sorában az egér embrionális fejlődésnek megfeleltethető humán embrió fejlődési stádiumok szerepelnek, a humán embrióra jellemző korong alakú („disc”) embrió morfológiával.



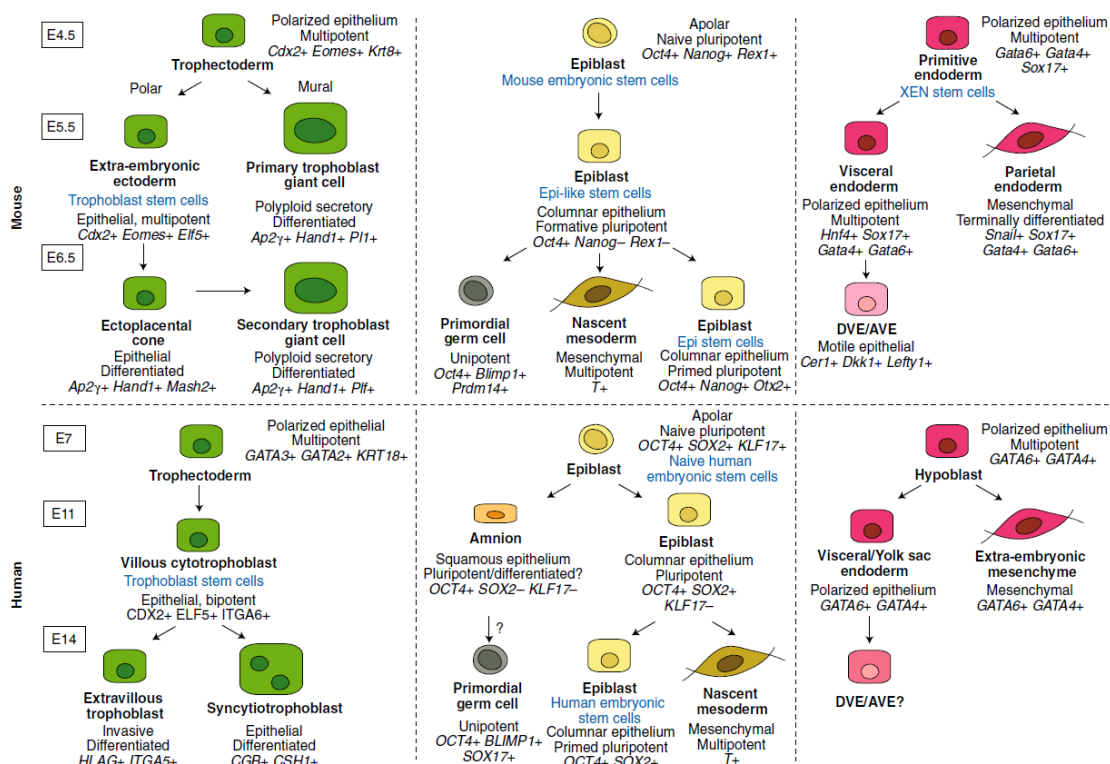
1. **ábra:** Az egér és a humán embrió implantáció utáni korai fejlődésének sematikus rajza, a hólyagcsíra állapottól a gasztruláció elindulásáig. (Shahbazi and Zernicka-Goetz, 2018) (DOI: 10.1038/s41556-018-0144-x)

Az embrionális fejlődés során az epiblaszt (más néven primitív ektoderma, világos sárga színnel szerepel az 1. ábrán) az egyik sejtréteg, amely a hólyagcsíra embrió ICM-ből azaz a belső sejtcsoomóból differenciálódik. Ez az a sejtréteg, amely az embrionális szöveteket létrehozza az implantációt követően, vagyis az ekto-, mezo- és endoderma ebből a sejtcsoportból differenciálódik a gasztruláció során. A hólyagcsíra külső sejtrétege a trofoblaszt (zöld színnel jelölt sejtek az 1. ábrán), míg a blasztocöl felőli sejtréteg a hypoblaszt (más néven primitív endoderma; piros színnel jelölt sejtek az 1. ábrán) zárja körül az epiblasztot. Vagyis ebben az értelemben a hólyagcsíra fejlődési stádiumú pre-implantációs embrió belső sejtcsoomójában már elkülönülnek az epiblaszt sejtek, amelyeket pluripotensnek tekintünk ebben a stádiumban.

Ha a bíráló kérdése a posztimplantációs stádium epiblaszt sejteire vonatkozott, akkor, ahogy azt a dolgozat 10. oldalán hivatkoztam, epiblaszt őssejteket (Epiblast Stem Cells, EpiSC) sikerrel hoztak létre egér, valamint patkány embriókból 2007-ben (Brons et al. 2007; Tesar et al. 2007), azonban pluripotenciájuk az ún. primed pluripotencia stádiumnak felel meg (Huang et al. 2012; Davidson et al., 2015; Weinberger et al., 2016). Ezt a 15. oldalon tárgyaltam a dolgozatban. Később, sertés embriókból is sikerrel izoláltak pregasztrulációs stádiumban EpiSC sejteket (Zhi et al. 2022) majd szarvasmarha embriókból is (Zhi et al. 2024).

Humán EpiESC sejtvonalak posztimplantációs embrióból etikai okok miatt nem kerülhetnek alapításra. Az egér és humán pluripotens sejtekről, valamint az embrionális stádiumok két faj közötti megfeleltethetőségéről több kiváló összefoglaló is megjelent az elmúlt években (Shahbazi and Zernicka-Goetz 2018; Fu et al. 2021; Ren et al. 2025). A már említett Shahbazi and Zernicka-Goetz összefoglalóból még egy ábrát szeretnék bemutatni, ahol a Cambridge Egyetem kutatói egy ábrán

nagyon szemléletesen összegyűjtötték az egér és humán pluripotens őssejteket fejlődési stádium és a hólyagcsíra embrió sejt típusai (trofoblaszt, epiblaszt, hypoblaszt) szerint (2. ábra). Jól látható, hogy az E7 stádiumban a naív, míg az E11 stádiumban a primed típusú ESC sejtek a megfelelő korú embrió epiblaszt sejtjeinek *in vitro* leszármazottjai.



2. ábra: Sejt típusok az implantáció utáni korai szakaszban lévő emlős embriókban, valamint az azokból izolált őssejtek és molekuláris markerei. A zöld szín a trofoblaszt, a sárga az epiblaszt, míg a piros szín a hypoblasztot jelöli. Az egyes őssejt típusok kék színnel vannak feltüntetve.

Makákó majmokon végzett főemlős kísérletek (*Macaca fascicularis*) azt mutatták, hogy a posztimplantációs makákó embrió epiblaszt sejtek az egér EpiSC és epiblaszt szerű (EpiLC) sejtekkel mutatnak génexpressziós hasonlóságot (Nakamura et al. 2016), ami arra enged következtetni, hogy a humán embriók esetében is hasonló potenciával rendelkezhetnek az epiblaszt sejtek a gastruláció stádiumáig. Emellett, a szintetikus embrió előállítási kísérletek, ahol a különböző őssejtekből kiindulva mesterségesen hoznak létre egy embriót, további eredményekre vezethet a humán embrió gastrulációs eseményeinek jobb megértése terén.

Referencia:

Brons, I.G., et al. (2007). Derivation of pluripotent epiblast stem cells from mammalian embryos. *Nature*, 448(7150), 191–195. DOI: 10.1038/nature05950.

Tesar, P.J., et al. (2007). New cell lines from mouse epiblast share defining features with human embryonic stem cells. *Nature*, 448(7150), 196–199. DOI: 10.1038/nature05972.

Huang, Y.R., et al. (2012). In Vivo differentiation potential of epiblast stem cells revealed by chimeric embryo formation *Cell Rep* 2(6): 1571–1578 DOI: 10.1016/j.celrep.2012.10.022

Davidson, K.C., et al. (2015). The pluripotent state in mouse and human" *Development* 142(18): 3090–3099 DOI: 10.1242/dev.116061

Weinberger, L.M., et al. (2016). Dynamic stem cell states: naive to primed pluripotency in rodents and humans. Nat Rev Mol Cell Biol 17(3): 155-169 DOI: 10.1038/nrm.2015.28

Zhi, M., et al.(2022). Generation and characterization of stable pig pregastrulation epiblast stem cell lines. Cell Res. 32(4):383-400. DOI: 10.1038/s41422-021-00592-9. Epub 2021 Nov 30.

Zhi, M., et al. (2024). Elucidation of the pluripotent potential of bovine embryonic lineages facilitates the establishment of formative stem cell lines. Cell Mol Life Sci. 81(1):427. DOI: 10.1007/s00018-024-05457-z.

Fu, J., et al (2021). Stem-cell-based embryo models for fundamental research and translation. Nat. Mater. 20, 132–144 DOI: 10.1038/s41563-020-00829-9

Ren, H., et al. (2025) The building blocks of embryo models: embryonic and extraembryonic stem cells. Cell Discov 11, 40 DOI: /10.1038/s41421-025-00780-6

Shahbazi, M.N., Zernicka-Goetz, M. (2018) Deconstructing and reconstructing the mouse and human early embryo. Nat Cell Biol 20, 878–887 (2018). DOI: 10.1038/s41556-018-0144-x

Nakamura, T., et al. (2016). A developmental coordinate of pluripotency among mice, monkeys and humans. Nature 537, 57–62 DOI: 10.1038/nature19096

2) Etikai szempontból, Magyarországon meddig engedélyezett humán embriót tenyésztben fenntartani?

Az érvényben lévő törvényi szabályozás szerint az Egészségügyi törvény (1997. évi CLIV. törvény az egészségügyről) rendelkezik „Az emberi reprodukcióra irányuló különleges eljárások, az embriókkal és ivarsejtekkel végzett kutatások” témakörben, azon belül az „Embriókkal, ivarsejtekkel végezhető kutatások, vizsgálatok és beavatkozások” szakaszban. A törvény 180.§ (3) rendelkezik a kutatásra felhasználható embriókról: „Embrió kutatási célból nem hozható létre, kutatáshoz csak a reprodukciós eljárások során létrejött embriót szabad felhasználni az arra jogosultak rendelkezése alapján vagy az embrió károsodása esetén.”

A 181.§ pedig meghatározza az embriók tenyésztben tarthatóságát:

181.§ (1) Azon embrió, amellyel kutatást végeztek, emberi szervezetbe nem ültethető be, kutatáshoz felhasznált ivarsejt reprodukciós eljárás végzéséhez nem alkalmazható. A kutatás során felhasznált embrió – a fagyasztva tárolás idejét nem számítva – legfeljebb 14 napig tartható életképes állapotban, a kutatás tartamát is figyelembe véve.

(2) E törvény alkalmazása szempontjából nem minősül embriókutatásnak a diagnosztikai vagy gyógykezelési célból, valamint az embrió visszaültetésre vagy beültetésre való alkalmasságának megállapítása érdekében végzett vizsgálat.

Referencia:

Nemzeti Jogszabálytár: <https://njt.hu/jogszabaly/1997-154-00-00.128#SZ167@BE3>

3) 11. oldal: hányszor lehetet (vagy lehetett?) az embryodarabolást megismételni ugyanazon a vonalon, úgy hogy még teljes értékű embryók jöjjenek létre? Mikor merül ki a pluripotencia a darabolt blasztomerekben?

Főként az emlősöknél, a megtermékenyített petesejt általában a 2-, 4-, és 8-sejtes stádiumig (ez azonban fajspecifikusan eltérő lehet), totipotensnek tekinthető, vagyis az embriót alkotó egyes sejtek, azaz blasztomerek képesek egy teljes szervezetet létrehozni, beleértve az extraembrionális szöveteket is. Ennek kísérletes bizonyítéka az embriódarabolási kísérleteken alapul, ahol embriódarabolással (*embryo splitting*) identikus ikrek hozhatók létre a blasztomerekből (Illmensee and Levanduski 2010; Zakrzewski et al., 2019).

Mindazonáltal ismert a morula vagy blasztociszta stádiumban alkalmazott kettéosztás is, amikor nem egy-egy blasztomert használnak fel, hanem kettévágják az embriót. Ez a módszer nagyállatok embrióin került kidolgozásra, azonban a két embriófél *in vitro* és *in vivo* túlélése is eltérő lehet, illetve fejlődési deformitások előfordultak a kísérletek során, nagyobb arányban, mint a blasztomerek alkalmazásakor. Ezt az eredményt később génexpressziós adatokkal is igazolták szarvasmarha embriókon végzett felezési kísérletek során (Velásquez et al. 2017). A téma irodalmát két publikáció is kiválóan összefoglalja, egyrészt Moore és Hasler 2017-es cikke a szarvasmarha tenyésztésben használt reprodukcióbíológiai technikákról, másrészt Rahbaram és kollégái több fajról készült összefoglaló cikke 2021-ből.

Az ún. többszörös embrió darabolást egér embrióban publikálták, három darabolási sorozatot végezve, különböző fejlődési stádiumban (2-, 4-, és 6-sejtes egér embriókon), ahol az első és második embriódarabolás még sikeres volt, azonban a harmadik sorozat már nem eredményezett embriószám növekedést a hólyagcsíra embriók számát összehasonlítva. Mindez azt bizonyította, hogy az embriószám növelése lehetséges a már felezett embriók újbóli felezésével, azonban a harmadik sorozat már ronthatja az eredményeket, a hatékonyság visszaesik (Illmense et al. 2006).

Referencia:

Illmensee, K. and M. Levanduski (2010). "Embryo splitting." Middle East Fertility Society Journal 15(2):57-63 DOI: 10.1016/j.mefs.2010.05.001

Zakrzewski, W., et al. (2019). "Stem cells: past, present, and future." Stem Cell Res Ther 10(1):68 DOI: 10.1186/s13287-019-1165-5

Velásquez, A.E., et al. (2017). Embryo splitting affects the transcriptome during elongation stage of in vitro-produced bovine blastocysts. Theriogenology 87:124–134. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2016.08.014.

Moore, S. G., and Hasler, J. F. (2017). A 100-year review: reproductive technologies in dairy science. Journal of Dairy Science. 100(12):10314–10331. DOI: 10.3168/jds.2017-13138.

Rahbaran, M., et al. (2021). Cloning and Embryo Splitting in Mammals: Brief History, Methods, and Achievements. Stem Cells Int. 2021:2347506. DOI: 10.1155/2021/2347506. Erratum in: Stem Cells Int. 2024 Jul 17;2024:9837676. DOI: 10.1155/2024/9837676.

Illmensee, K., et al. (2006). In-vitro blastocyst development from serially split mouse embryos and future implications for human ART Fertil Steril, 86, pp. 1112-1120. DOI: 10.1016/j.fertnstert.2006.02.103

4) Az ESC sejtvonalakat rendszerint blasztula ICM-ből alapítják. Lehet morulából vagy csak egy blasztomeréből pluripotens sejtvonalat létrehozni?

Igen, lehetséges. Morula fejlődési stádiumú embriósejtekből is sikerrel hoztak létre embrionális őssejteket több fajban is. Egér embriókból már 1989-ben (Eistetter, 1989) amerikai nyérc embrióból 1993-ban (Sukoyan et al. 1993), szarvasmarha embrióból 1996-ban (Stice et al. 1996), még humán embriókon végzett kísérletben 2004-ben publikálták elsőként a morula fejlődési stádiumú embrió eredetű ESC sejtvonalak alapítását (Strelchenko et al. 2004).

Ugyanígy, egyedi blasztomerekből is sikerült már ESC sejtvonalakat előállítani, így egér (Chung et al. 2005; Lorthongpanich et al. 2008) és humán blasztomerekből is (Geens et al 2009). Azonban, ahogy a bíráló is említette, e sejtvonal alapítási technika széleskörű alkalmazása nem terjedt el, amely összefüggésbe hozható az ESC sejtek alacsonyabb előállítási hatékonyságával, valamint a blasztomer izolálás esetén annak technikai igényeivel (mikroszkóp és mikromanipulátor).

Referencia:

Eistetter, H.R., (1989). Pluripotent embryonal stem cells can be established from disaggregated mouse morulae. *Development, Growth and Differentiation* 31, 275–282. DOI: 10.1111/j.1440-169X.1989.00275.x

Sukoyan, M.A., et al. (1993). Embryonic stem cells derived from morulae, inner cell mass, and blastocysts of mink: comparisons of their pluripotencies. *Molecular Reproduction and Development* 36, 148–158. DOI: 10.1002/mrd.1080360205

Stice, S.L., et al. (1996). Pluripotent bovine embryonic cell lines direct embryonic development following nuclear transfer. *Biology of Reproduction* 54, 100–110. DOI: 10.1095/biolreprod54.1.100

Strelchenko, N., et al. (2004). Morula-derived human embryonic stem cells. *Reprod. Biomed. Online* 9: 623–629. DOI: 10.1016/S1472-6483(10)61772-5

Geens, M., et al (2009). Human embryonic stem cell lines derived from single blastomeres of two 4-cell stage embryos, *Human Reproduction*, 24(11), pp 2709–2717, DOI: 10.1093/humrep/dep262

Chung, Y., et al. (2005). Embryonic and extraembryonic stem cell lines derived from single mouse blastomeres, *Nature*, 2005, vol. 439 (pg. 216-219) DOI: 10.1038/nature04277

Lorthongpanich, C., et al. (2008). Development of single mouse blastomeres into blastocysts, outgrowth and the establishment of embryonic stem cells, *Reproduction*, 2008, vol. 135 (pg. 805-813) DOI: 10.1530/REP-07-0478

5) Lehet-e alacsonyabb rendű gerincesekben (hüllő, kételtű) is létrehozni pluripotens őssejtvonalat?

Halakban igen, ott erre több példa is van, így például zebradánio, medaka, tengeri durbincs, tengeri sügér és még további halfajokon embrionális eredetű pluripotens őssejtek izolálására (részletes összefoglalót a területről például Hong, et al 2000-es cikke és Walsh, et al 2020-as publikációja közöl).

Azonban az emlősökhöz hasonló embrionális őssejteket hüllők vagy kételtűek esetén eddig nem írtak le. Léteznek multipotensnek tekintett embrionális tenyészetek, amelyek hosszabb ideig fenntarthatók *in vitro* tenyészetben (pl: az embrionális idegléc sejtek, angolul neural crest), vagy szöveti eredetű őssejtek (epitheliális vagy mezechimális őssejtek) főként modellállatokon kerültek jellemzésre és publikálásra, mint például a dél-afrikai karmosbékán (*Xenopus laevis*, Sukparangsi et al. 2022). Azonban embrionális fejlődésük eltérő mivolta miatt a halakéhoz hasonlóan kihívást jelent az egyes fejlődési stádiumok és az ahhoz csatlakozó génexpressziós mintázatok térképezése, amely elengedhetetlen

feltétele a megfelelő stádium és módszertan kiválasztásának a korlátlan ideig tenyésztésben tartható, teljes egyed létrehozására képes (azaz pluripotens embrionális eredetű) sejt kultúrák létrehozásának. A géntérképek növekvő száma, illetve a szekvenálási módszerek fejlődése új kutatásokat eredményez, amely eredmények segíthetik az alacsonyabb rendű gerincesek embrionális fejlődésének, valamint a pluripotencia tulajdonság ezen fajok estében való jobb megértését (York et al. 2024).

Mindazonáltal az iPSC technológia, a genetikai újraprogramozás lehetővé tette, hogy iPSC sejteket hozzanak létre mind hüllők, kételtűek, mind halak esetén. Vagyis a genetikai újraprogramozás révén igen, van példa iPSC-szerű sejtek létrehozására az alacsonyabb rendű gerinces fajokban is, példaként itt is a karmosbékát emelném ki (Céline et al. 2012). Azonban fontos megjegyezni, hogy a területen megjelent publikációk száma igen alacsony.

Referencia:

Hong, Y., Chen, S. & Scharl, M. Embryonic stem cells in fish: current status and perspectives. *Fish Physiology and Biochemistry* 22, 165–170 (2000). DOI: 10.1023/A:1007871121784

Walsh, et al. (2024). Advances in development of long-term embryonic stem cell-like cultures from a marine fish, *Sciaenops ocellatus*. *Current Research in Food Science* 9: 100841. DOI: 10.1016/j.crfs.2024.100841.

Sukparangsi, W., et al. (2022). Evolutionary origin of vertebrate OCT4/POU5 functions in supporting pluripotency. *Nat Commun* 13, 5537 DOI: 10.1038/s41467-022-32481-z

York, J.R., et al. (2024). Shared features of blastula and neural crest stem cells evolved at the base of vertebrates. *Nat Ecol Evol* 8, 1680–1692 (2024). DOI: 10.1038/s41559-024-02476-8

Céline, V., et al. (2012). Non-viral Expression of Mouse Oct4, Sox2, and Klf4 Transcription Factors Efficiently Reprograms Tadpole Muscle Fibers in Vivo- *Journal of Biological Chemistry*, Volume 287, Issue 10, 7427 – 7435 DOI: 10.1074/jbc.M111.324368

6) 25. oldal: az 5. ábra a 10 évvel ezelőtti állapotot foglalja össze. Izgalmas lett volna olvasni, hogy a szakember szerint mi a helyzet a 2023-24-es években. Hol tart ma az iPSC sejtek előállítás és felhasználási potenciálja? Mi a legfigyelemre méltóbb felfedezés, ami az elmúlt egy évizedben történt ezeknek a sejteknek a klinikai alkalmazásában?

Habár az ábra egy 2014-es tanulmányból származik, azt kell, hogy mondjam, a séma nem sokat változott az iPSC sejtek előállítását tekintve. A fő kutatási területek továbbra is a hatékony és biztonságos őssejt előállításra koncentrálnak, vagyis a módszertani oldal tökéletesítésére: minél rövidebb idő alatt, minél kisebb költséggel (vagyis optimális tenyésztési paraméterek mellett) pluripotens sejt vonalak létrehozása, a különböző ún. downstream felhasználásnak megfelelően. Fontos szempont a „host genom” minél kevésbé való megzavarása (integrációmentes genetikai újraprogramozás), valamint a hatékony és teljes újraprogramozás (például kismolekulák alkalmazásával), a pluripotens stádium elérése. A sejtek biztonságos alkalmazhatósága a transzplantációs terápiában emellett a differenciációs protokollok tökéletesítését igényli, amelyhez elengedhetetlen az egyes sejt típusok differenciálódási útvonalainak minél tökéletesebb megértése. Itt az egy-sejt RNS szekvenálási kísérletek térhódítása jelent komoly előrelépést mind a differenciációt irányító génexpressziós változások feltérképezése és megértése, mind a differenciálódott sejt típus génexpressziós újlényomatának felvétele szempontjából. Meg kell még említeni a célzott génszerkesztést is, mint a CRISPR, amely számos új lehetőséget biztosít mind a betegségmodellezés, mind pedig a genetikai hibák javítása területén. Itt Liu és munkatársai

2020-as összefoglalóját emelném ki, amely időrendben mutatja be az iPSC technológia fejlődését (Liu et al. 2020)

Ugyanakkor a dolgozat 2.6 fejezete (26-28 o.), az „Új kutatási irányok az őssejtbiológiában” című szakasz a legújabb kutatási irányokat ismerteti a teljesség igénye nélkül, kitekintést nyújtva olyan technológiák felé, mint az *in vitro* gametogenezis (IVG) vagyis ivarsejtek *in vitro* differenciáltatása őssejtekből, vagy az ivarsejt-mentes iPSC sejtekből kiinduló hólyagcsíra embrió előállítás, vagy a poszt-implantációs embriófejlődés modellezése *ex utero*, őssejtekből kiindulva. De itt esik szó az egyre gyorsabban fejlődő ún. assembloid 3D szövettenyésztési technológiáról is, ahol a szövetek komplexitásának modellezéséhez a különböző 3D struktúrák fuzionáltatásával sikerül egészen összetett szöveti struktúrákat előállítani. Azt gondolom, hogy ez a szakasz, ha nem is teljeskörűen, de néhány izgalmas példán keresztül mutatja meg az iPSC sejtek felhasználási irányait és páratlan biológiai potenciálját.

A klinikai alkalmazásra azonban valóban nem tértem ki, úgy éreztem, hogy ez a terület már távolabb áll a dolgozatban bemutatott eredményektől, hogy konkrét betegségmodellek, a kiméra antigén receptor (CAR) T-sejtek fejlesztések, vagy a transzplantációs medicina területéről adjak bővebb kitekintést a humán gyógyászat területéről. Itt három összefoglaló cikket is idéznék: Kim et al. 2022; Kobold et al. 2023; valamint a technológia kidolgozójának cikkét 2024-ből (Hui and Yamanaka, 2024) amelyek mindegyike az iPSC technológia klinikai alkalmazásának eddigi eredményeit és jövőbeni alkalmazási lehetőségeit elemzi.

Referencia:

Liu, G, et al. (2020). Advances in Pluripotent Stem Cells: History, Mechanisms, Technologies, and Applications. Stem Cell Rev Rep. 16(1):3-32. DOI: 10.1007/s12015-019-09935-x.

Kim, J. Y., et al. (2022). Review of the current trends in clinical trials involving induced pluripotent stem cells. Stem Cell Reviews and Reports, 18(1), 142–154. DOI: 10.1007/s12015-021-10262-3

Kobold, S., et al. (2023). History and current status of clinical studies using human pluripotent stem cells. Stem Cell Reports, 18(8), 1592–1598. DOI: 10.1016/j.stemcr.2023.03.005

Hui, K.K., and Yamanaka, S. (2024). iPS cell therapy 2.0: Preparing for next-generation regenerative medicine. Bioessays. 46(12):e2400072. DOI: 10.1002/bies.202400072. Epub 2024 Jun 25.

7) Van-e olyan marker/ellenanyag, ami a hosszú ideig fenntartott pluripotens őssejtklónokban kizárólag a differenciálatlan alakokat jelöli és ezzel ellenőrizni lehet a pluripotens sejtvonal állapotát?

Ha egyetlen markerre gondol, akkor mai tudásunk szerint ilyen nincs. A pluripotencia összetett sejttálapot, egyetlen marker megléte vagy expressziójának megszűnése nem tudja önállóan jelezni, hogy egy sejt pluripotens-e vagy sem. Ráadásul fajok között is különbségek vannak, így más génekről/fehérjékről beszélünk humán és másokról mondjuk egér őssejtek esetén. A nemzetközi őssejt kutatási társaság (ISSCR) által kiadott protokoll a humán őssejtekre vonatkozóan egy részletes panelt és több módszert is megad, amellyel a pluripotencia ellenőrizendő (Ludwig et al. 2023; ISSCR Society 2023). A legtöbb őssejt azonosítására használt marker ugyanis olyan sejteken is expresszál, amelyek nem rendelkeznek differenciációs képességgel, mint például a csírasejt eredetű tumorokból származó nullipotens embrionális karcinóma sejtek. Ezek a sejtek expresszálnak például OCT4 (POU5F1) és NANOG markereket, habár nem pluripotensek.

Mégis, talán az egyik legjobb jelző a POU5F1 (régi nevén OCT4) fehérje, amelynek expressziója elengedhetetlen a pluripotencia állapot fennmaradása során, így, ha expressziója jelentősen lecsökken vagy megszűnik, akkor az *in vitro* tenyésztetben tartott őssejtek valószínűleg differenciálódni kezdtek. Azonban fordítva ez már nem igaz: egy sejt, amely expresszálja a POU5F1-et, de további őssejt markereket nem, nem tekinthető pluripotensnek. Más szerzők a TRA-1-60 markert tekintik hasonlóan hatékony jelzőnek a humán őssejtek esetén, ugyanazon korlátok mellett, ahogy azt az OCT4-nél említettem.

Referencia:

Ludwig, T. E., et al. (2023). ISSCR standards for the use of human stem cells in basic research. *Stem Cell Rep.* 18, 1744–1752. DOI: 10.1016/j.stemcr.2023.08.003

ISSCR Society. (2023). The ISSCR's Standards for Human Stem Cell Use in Research. <https://www.isscr.org/basic-research-standards>

8) A microarray génexpressziós vizsgálatok a genomnak csak töredékét vizsgálja. Végeztek-e ennél mélyebb szintű (pl. RNAseq, ATACseq) genetikai analíziseket a sejtmagtranszplantált eredetű embryok őssejtjein?

Ahogy a bíráló a bírálatában megjegyezte, ezek a kísérleti eredmények több mint 10 éve születtek – az akkor elérhető technológiai színvonalnak megfelelően. Sajnos a kutatások a sejtmagátültetéssel létrehozott sejteken csak az epigenetikai kutatások irányában folytatódtak egy együttműködés keretében, amely eredményeit publikáltuk 2019-ben (Dirks et al. 2019), azonban a teljes genom génexpressziós profilozása nem valósult meg. Ennek részben forrás oldalról voltak korlátai, másrészt jelentősen csökkent a sejtmagátültetéssel létrehozott embriókból izolált őssejtvonalak iránti tudományos érdeklődés is: inkább az iPSC sejtek felé fordult a tudományos közösség. Így saját kutatási eredményeikről, a kísérletek folytatásáról ebben a tekintetben nem tudok beszámolni.

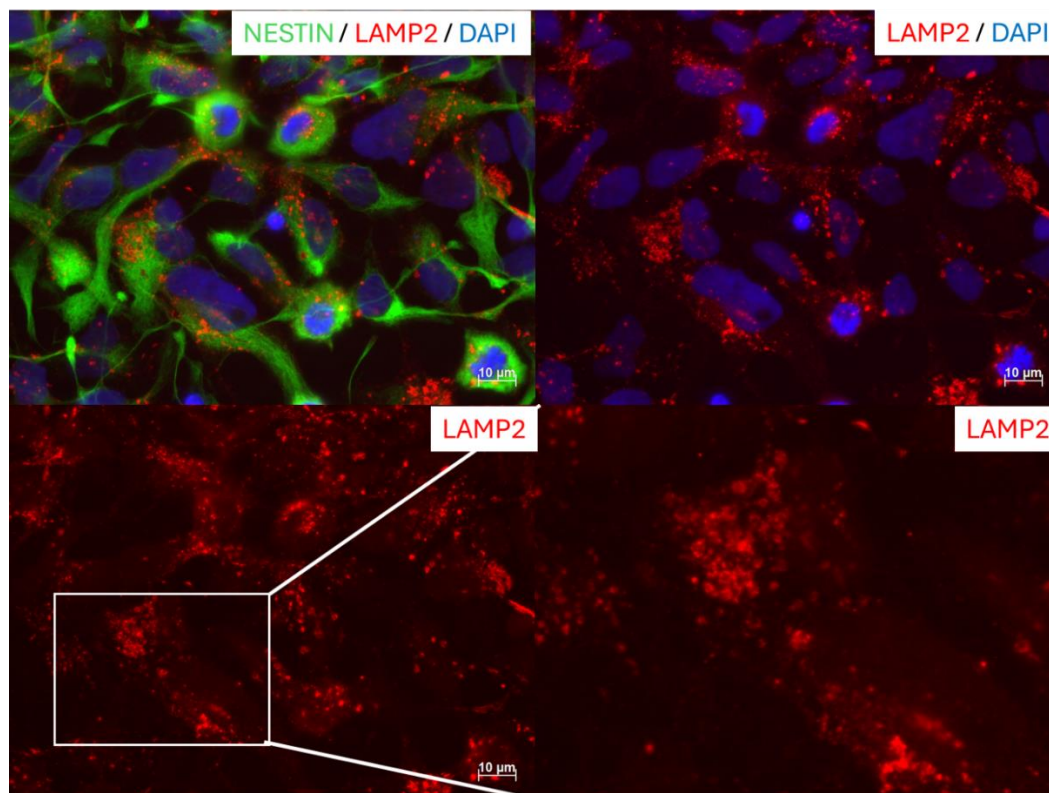
Referencia:

Dirks, et al. (2019). Allele-specific RNA-seq expression profiling of imprinted genes in mouse isogenic pluripotent states. *Epigenetics & Chromatin* 12: 14. 21p DOI: 10.1186/s13072-019-0259-8

9) 75. oldal: milyen LAMP2+ struktúrákra (vakuolumokra) gondol? Van-e saját elektronmikroszkópos eredmény arra vonatkozóan, hogy nagy számú lizoszóma van az NPC és TD35 sejtekben?

A 75. oldal szövege a 76. oldalon bemutatott 27. ábra a-paneljére utal. Az immuncitokémiai jelölés (piros, Alexa 594) a LAMP2 vagyis a lizoszóma-asszociált membrán glikoprotein 2 (*lysosome-associated membrane glycoprotein 2*; LAMP2; [UniProt: P13743](#)) pozitív sejtorganellumokat jelölte. Itt elnézést kell kérnem a bírálótól és a dolgozat olvasótól, hogy hibásan „vakuolum” szó szerepel a szövegben, ez nyilvánvaló hiba az állati sejtek esetében, nagyon sajnálom, hogy elkerülte a figyelmemet ez a hiba. Helyesen vezikulumként kellett volna szerepelnie, természetesen itt ebben a szakaszban is vezikulumokról van szó. A 27. ábra A panel esetén, ahol a vezikulum mérete elég nagy, ott jól látszik ebben a nagyításban is a membrán lokalizáció. Valóban, talán célszerű lett volna egy nagyobb nagyítású inzert elhelyezése, amely segíti a LAMP2 jelölés megítélését. Sajnálom, hogy ez kimaradt, ezt most

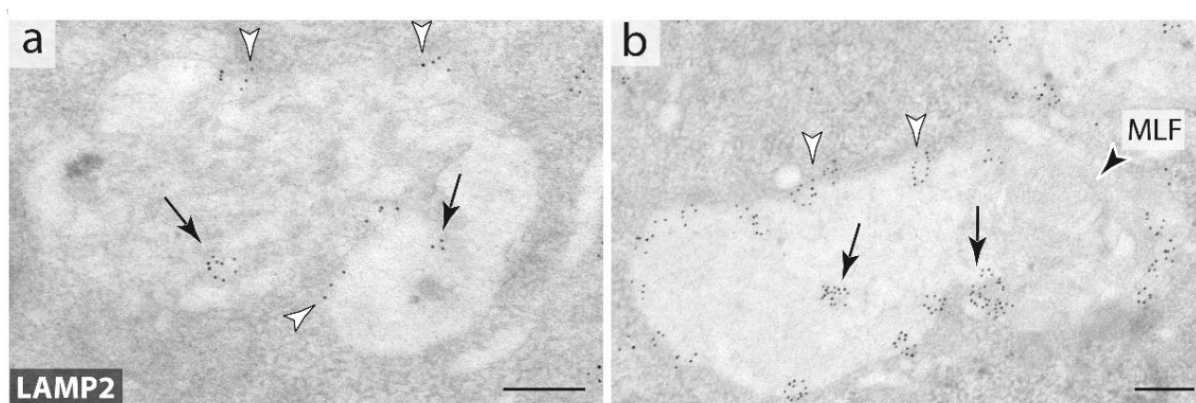
pótlom egy reprezentatív festés bemutatásán keresztül az egyik MPSII betegség által érintett sejtvonal NPC tenyészet fotójának bemutatásával (3. ábra).



3. ábra. LAMP2 immunfestés MPSII-4.1 iPSC sejtvonalból differenciált NPC tenyészetben. (zöld: *NESTIN*; piros: *LAMP2*; kék: *DAPI* sejtmagfestés) (saját felvétel).

E mellett a 27. ábra d-panelje kvalitatív összehasonlításra módot adó Western-blot analízis eredményeit mutatja be, ahol jól látható, hogy az MPSII mutáció által érintett sejtvonalak esetén az NPC sejtekben jelentősen megnövekedett LAMP2 szint volt kimutatható.

Az elektronmikroszkópos felvételek saját felvételeink, az ELTE Anatómia, Sejt- és Fejlődésbiológia Tanszékén együttműködésben készültek, Dr. Molnár Kinga és Dr. László Lajos szakértő közreműködésével. A dolgozat 4.5.4 fejezete és az ott bemutatott 28. ábra az NPC és TD35 sejtek ultrastrukturális elemzését mutatja. Itt jól azonosíthatók a különböző tároló vezikulumok és azok deformitásai, amelyeket megfigyeltünk. A hivatkozott Kobalak et al. 2019 publikáció, amely a dolgozatban részben bemutatásra kerül további adatokat is tartalmaz e tekintetben, többek között a kiegészítő anyagban (Supplementary Figures) 7 elektronmikroszkópos panelt mutattunk be az MPSII betegségben érintett iPSC eredetű neurális sejtenyészetek ultrastrukturális jellemzőiről. Azonban ezeket a dolgozat terjedelmi korlátai miatt sajnos nem volt módomban részletesen ismertetni, csak a publikáció kis része az, amely a dolgozatban bemutatásra került, főként az összejtes modell és kisebb részben a neuropatológia. Az alábbi 4. ábra a LAMP2 immunogold jelöléssel készült elektronmikroszkópos felvételt mutatja be. Az immunogold jelölés a LAMP2+ vezikulákat jelöli a citoplazmában, amellyel egyértelműen be tudtuk azonosítani a LAMP2+ tároló vezikulákat ultrastrukturális szinten is a sejtekben.



4. ábra: LAMP2 immunogold jelölés MPSII NPC sejteken. A két részlet (a és b) két sejt különböző részeiről származik. (Jelölések: fehér nyílhegy: arany szemcse; fekete nyíl: belső vezikulák; fekete nyílhegy: kisméretű vezikulák; MLF: multilamelláris alakzat; méretvonal: 200 nm) (Kobolák et al 2019 alapján módosítva).

Az elektronmikroszkópos felvételek sajátja, hogy egy-egy felvételen kis területet tudunk analizálni, így számos felvétel vizsgálatára van szükség a pontos kép kirajzolásához. Ezért egy szemikvantitatív analízissel hasonlítottuk össze a különböző DNS mutációkat hordozó betegek mintáit, amely eredményeket az alábbi táblázatban (1. Táblázat) mutatok be. Ezek az adatok a Kobolák et al 2019 publikációban kerültek közlésre, a kiegészítő anyag részeként, azonban a dolgozatba nem kerültek be.

1. táblázat: A tároló vezikula típusok előfordulásának félkvantitatív értékelése NPC és TD sejtekben.

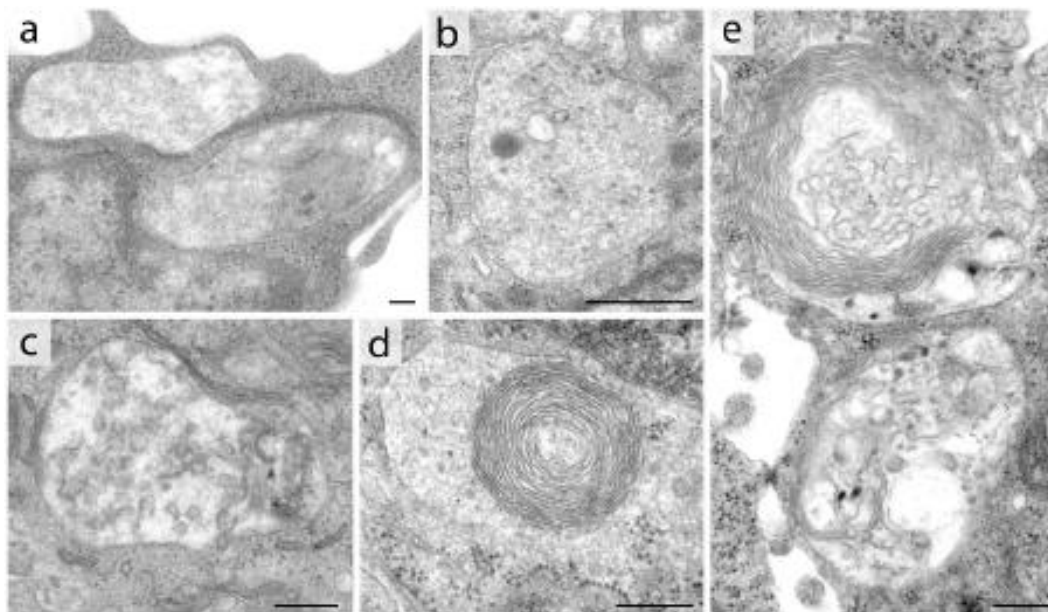
Az egyes oszlopokban az első érték az NPC, míg a második érték a TD sejt kultúrák mintáira vonatkozik. Az utolsó oszlop az összes megfigyelt tároló vezikula számát adja meg. A vezikula típusainak gyakoriságát a következő jelölésekkel jelöltük: - / (+) / + / ++ / +++, amennyiben a vezikulák száma 0 / 1 / <5 / 8-10 / >10 volt.

Sejtvonal	tároló vezikula típusok megoszlása				összes tároló vezikula szám
	primer	globuláris	multilamelláris	szekvesztrált	
CTRL	+ / -	+ / (+)	(+) / -	+ / +	7 / 3
MPSII-M.1	+++ / ++	++ / -	- / -	+ / (+)	51 / 13
MPSII-1.3	++ / +++	++ / +	++ / -	++ / ++	34 / 49
MPSII-2.5	+++ / +++	+ / +	- / (+)	+ / (+)	29 / 37
MPSII-4.1	+++ / ++	+++ / +	++ / +	++ / +	47 / 17

A szemikvantitatív analízis a kontrollhoz képest szignifikáns eltérést mutat a tároló vezikulumok számát illetően a vizsgált beteg és hordozó mintákban, azonban a mutációtól és a sejtípustól függően eltéréseket mutatott a betegek között. A bíráló kérdése kapcsán még egy fontos dolgot kell megvilágítanom. Amikor lizoszómáról beszélünk, akkor nem egyféle lizoszómára gondolhatunk. A Golgi rendszerben újonnan képződő lizoszómák az ún. elsődleges vagy primer lizoszómák. Amikor azonban egy primer lizoszóma fúzionál egy másik, pl. endocitotikus vezikulával, kialakul a másodlagos vagy szekunder lizoszóma. Az endocitózis során a sejtekbe kerülő anyagok ún. endocitotikus vezikulumokba csomagolva fűződnek le a plazmamembránról, amelyek érésük során késői endoszómává azaz multivezikuláris testté alakulnak, mely a lizoszómával egyesülve hozza létre az endolizoszómát. A késői endoszómák mellett autofagoszómákkal egyaránt egyesülhetnek.

Az MPSII modellt leíró publikációnk kiegészítő anyagában bemutattunk egy ábrát (S3 ábra, Supplementary Figures; Kobolák et al. 2019); ahol az NPC és TD tenyészetekben azonosítható tároló vezikulákat mutattuk be. Ezt az ábrát most itt is bemutatom, visszautalva az előzőekben bemutatott

1. Táblázatra. Az ábra jól mutatja, hogy többféle tároló vezikula felhalmozódásáról beszélünk a betegségben érintett sejtekben, azonban ezek aránya az egyes IDS enzim mutációktól is függ.



5. **ábra:** Az iPSC sejtekből differenciált NPC tenyészetekben azonosított tároló vezikulumok. a-b) Az elsődleges tároló vezikulumok kizárólag vagy túlnyomórészt flokkuláris (a panel) vagy fibrilláris-granuláris (b panel) anyagot tartalmaznak. c) A gömb alakú vezikulák főként intraluminális vezikulákat tartalmaztak. d) Multilamelláris vezikulák membránörvényt hordoztak. e) A szekvesztrált típusú vezikulák intraluminális vezikulákat, membránörvényeket és beépült citoplazmatikus maradványokat tartalmaznak (méretvonal: 100 nm).

Összefoglalva, az ultrastruktúális vizsgálatokkal nem tudtuk egyértelműen igazolni, hogy olyan lizoszómákról lenne szó, ahol még zajlik emésztés. Modellünk szerint az endolizoszómális rendszerben felhalmozódó tároló vezikulák többféle emésztetlen anyagot hordoznak. A kvantitatív módszertan (Western-blot) valamint a kvalitatív eljárások, az immuncitokémia és ELMI módszertan segítségével kimutatható volt, hogy a tároló vezikulák felhalmozódása differenciálódási stádiumtól függ, amelyet a dolgozat 5.5 fejezetében fejtettem ki bővebben.

Referencia:

Kobolák, J., et al. (2019). Modelling the neuropathology of lysosomal storage disorders through disease-specific human induced pluripotent stem cells. *Experimental Cell Research* 380: 2 pp. 216-233, 18p. DOI: 10.1016/j.yexcr.2019.04.021

Molnár, K., et al. (2022). Golgi requires a new casting in the screenplay of mucopolysaccharidosis II cytopathology. *BIOLOGIA FUTURA* 73: 31-42 12 p. (2022) DOI: 10.1007/s42977-021-00107-y

10) -Milyen szerepet töltenek be a lizoszómális fehérjék az idegi sejtekben?

Amennyiben a bíráló a lizoszómális fehérjék alatt a lizoszómális enzimekre gondol, akkor nagyszámú hidrolitikus enzimről beszélhetünk. Ezek lehetnek nukleázok, lipázok, karbohidrázok, foszfatázok, proteázok stb. attól függően, hogy milyen makromolekula bontásában vesznek részt.

Az eukarióta sejtek működésének szabályozásában meghatározó szerepet játszanak a lizoszómák. A makromolekulák lebontásának és a tápanyagok újrahasznosításának helyszíneiként számos sejtfunkciót

támogatnak, vagyis részt vesznek az intracelluláris emésztés folyamatában. A lizoszómák olyan vezikulák, amelyek hidrolitikus enzimaktivitással rendelkező fehérjéket (hidrolázok) tartalmaznak, lebontják a már nem szükséges anyagokat, sejtmaradványokat vagy idegen anyagokat (antigének) sejtépítő anyagokra (aminosavak, nukleinsavak, cukrok, lipidek és fémek) amelyek azután a citoplazmában kerülnek újrahasznosításra. A hidrolitikus és újrahasznosító funkciók mellett a lizoszómák jelátviteli platformként is szolgálnak, amely integrálja a tápanyag- és anyagcsere-jeleket az mTORC1 útvonalon keresztül történő jelátvitel szabályozásához.

A lizoszómák az endocitotikus és autofágikus szállítmányok lebontásának központjaként szolgálnak, ami elengedhetetlen az idegsejtek működéséhez és túléléséhez. A lizoszómák működésének zavara a legtöbb lizoszomális tárolási rendellenességben progresszív neurodegeneratív folyamatokhoz vezet, és hozzájárul az öregedéssel kapcsolatos neurodegeneratív betegségek kialakulásához. A lizoszomális tárolási betegségekről szóló irodalmi áttekintés éppen ezt a funkciót, illetve annak sérülése estén bekövetkező neurális tüneteket mutatta be a 2.7.1. és az 5.5 fejezetekben.

A lizoszomális rendszer megfelelő működése tehát elengedhetetlen a neuronok megfelelő anyagcseréje és működése szempontjából. A lizoszómák nem csak a neuronsejtek sejt-testében (*cell-body*), hanem sejtsszerte megtalálhatók, így a nyúlványokban is és kompartment-specifikus funkciókat látnak el a neuronsejtek igényeinek megfelelően. Például az axonokban a sérült mitokondriumok körül autofagoszómák megjelenését írták le (Ashrafi et al, 2014; Kuijpers et al. 2021), míg a lizoszomális proteolízis szelektív blokkolása esetén az axonális transzport felborulását és axon disztrófiát írtak le (Lee et al. 2011). A neurodegeneratív betegségek esetén, így az Alzheimer betegségben is egyre több bizonyíték utal az endolizoszomális rendszer érintettségére a betegség patomechanizmusában (Hu et al. 2015).

Referencia:

Roney, J.C., et al. (2022). Neuronal endolysosomal transport and lysosomal functionality in maintaining axonostasis. *J Cell Biol*; 221 (3): e202111077. DOI: 10.1083/jcb.202111077

Ferguson, S.M., (2019). Neuronal lysosomes. *Neurosci Lett*. 697:1-9. DOI: 10.1016/j.neulet.2018.04.005. Epub 2018 Apr 4.

Ashrafi, G., et al. (2014). Mitophagy of damaged mitochondria occurs locally in distal neuronal axons and requires PINK1 and Parkin. *J Cell Biol*. 206(5):655–70. DOI: 10.1083/jcb.201401070.

Kuijpers M, et al. (2021). The axonal endo-lysosomal and autophagic systems. *J Neurochem*. 158: 589–602. DOI: 10.1111/jnc.15287

Lee, S., et al. (2011). Lysosomal proteolysis inhibition selectively disrupts axonal transport of degradative organelles and causes an Alzheimer's-like axonal dystrophy. *J Neurosci*. 31(21):7817–30. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.6412-10.2011.

Hu, YB., et al. (2015). The endosomal-lysosomal system: from acidification and cargo sorting to neurodegeneration. *Transl Neurodegener* 4, 18. DOI: 10.1186/s40035-015-0041-1

11) -Milyen kritériumok alapján lehet teljes biztonsággal megállapítani, hogy az iPSC sejtekből programozással differenciált neuronokat hoztunk létre? Milyen a neurális differenciáció %-os hatékonysága?

A neuronális differenciáció során a jellegzetes sejtmorfológiai változások mellett, amely az idegsejtek sajátja, sejtspecifikus fehérjék (például enzimek, strukturális fehérjék, transzkripció faktorok) expresszióját vizsgáljuk, főként immuncitokémiai vizsgálatokkal. Emellett az elektrofiziológiai aktivitás, valamint ultrastrukturális vizsgálatok is bizonyítékot szolgáltathatnak a differenciáció irányára vonatkozóan.

Az idegi differenciációs protokollok zöme első lépésben neurális prekursor sejteket (NPC) hoz létre, amelyek azután több sejttypussá differenciálthatók. Számos eredmény olvasható az irodalomban a differenciáció hatékonyságáról, azonban ez jelentősen eltér az egyes laboratóriumok között, függve az alkalmazott protokolltól és az iPSC sejtvonaltól is. Én itt saját tapasztalatainkat tudom megosztani. Az általunk alkalmazott differenciációs protokollal, amely Shi és munkatársai módszerére épült (Shi et al 2012), a különböző genetikai háttérű (értsd: különböző donoroktól származó) iPSC sejtvonalak 5 és 25% közötti hatékonysággal voltak NPC sejtekké differenciálthatóak, a kiindulási iPSC sejtszámot és az NPC sejtekből álló rosetták izolálásakor mért sejtszámot tekintve.

Referencia:

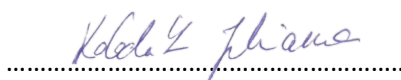
Castillo Bautista CM, and Sternecker J. (2023). Progress and challenges in directing the differentiation of human iPSCs into spinal motor neurons. Front Cell Dev Biol. 10:1089970. DOI: 10.3389/fcell.2022.1089970.

Shi, Y., et al. (2012). Directed differentiation of human pluripotent stem cells to cerebral cortex neurons and neural networks. Nat Protoc 7(10): 1836-1846 DOI: 10.1038/nprot.2012.116

Végezetül szeretném megköszönni a részletes bírálatot és javaslatait, remélem, hogy kérdéseire adott válaszaimat a bíráló elfogadja.

Tisztelettel:

Kelt: Gödöllő, 2025. június 02.



Dr. Kobolák Julianna Ilona