

**MÁJSPECIFIKUS TRANSZPORTEREK
KIFEJEZŐDÉSÉNEK VIZSGÁLATA HUMÁN
EMBRIONÁLIS ÖSSEJTEKBŐL DIFFERENCIÁLTATOTT
MÁJSEJT-SZERŰ SEJTEKBEN**

Doktori értekezés

Török György

Eötvös Lóránd Tudományegyetem, Természettudományi Kar,
Biológia Doktori Iskola, Molekuláris sejt- és neurobiológia oktatási program

Doktori iskola vezetője: Prof. Erdei Anna

Programvezető: Dr. Juhász Gábor

Témavezető: Dr. Homolya László, DSc - tudományos tanácsadó

Kutatóhely: Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet



Budapest

2020

TARTALOMJEGYZÉK

Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
1.1. Az emberi máj felépítése és funkciója	7
1.1.1. A máj anatómiája és keringési rendszere	7
1.1.2. A máj sejt típusainak és a májfunkciónak az áttekintése	10
1.2. A membrántranszporterek általános áttekintése és szerepük a különböző májfunkciókban	13
1.3. Az emberi őssejt típusai és felhasználási lehetőségei	18
1.4. Májmodellek és májirányú őssejt-differenciációs eljárások	21
1.4.1. Májsejt modellek	21
1.4.2. Májirányú őssejt-differenciációs eljárások	23
1.4.3. Májirányú őssejt-differenciációs markerek	25
2. Célkitűzések	27
3. Anyagok és módszerek	28
3.1. A munkánk során használt sejt vonalak tenyésztése	28
3.1.1. A humán pluripotens őssejt tenyésztése	28
3.1.2. A HepG2 sejt vonal tenyésztése	28
3.1.3. A HepaRG sejtek fenntartása	28
3.1.4. A genetikailag módosított HUES9 sejtek fenntartása és differenciáltatása	29
3.2. Az embrionális őssejt vonalak májirányú differenciáltatása	29
3.2.1. Tenyésztő edények befedése Matrigellel	29
3.2.2. Az őssejt előkészítése a differenciációhoz	29
3.2.3. A májirányú differenciáció lépései	30
3.2.4. Két fedőréteg közötti (szendvics) tenyészetek készítése	31
3.2.5. Taurourszodeoxikolsav (TUDCA) kezelés	31
3.3. Sejtosztódási vizsgálatok	31
3.4. A differenciált sejt funkcionális vizsgálata	31
3.4.1. Urea és albumin mérés	31
3.4.2. Az 5(6)-karboxi-2',7'-diklorofluoreszcein diacetát (CDCFDA) kipumpálásának vizsgálata	32
3.5. Immuncitokémiai vizsgálatok	32
3.6. Génkifejeződések vizsgálata kvantitatív valós idejű PCR-rel (qPCR)	33

4. Eredmények és megvitatásuk	37
4.1. Hatékony differenciációs protokoll beállítása HUES9 őssejtekre	37
4.2. Morfológiai és sejtosztódási vizsgálatok HUES9 sejtek májirányú differenciációja során.....	40
4.3. Funkcionális mérések és májspecifikus markerek kifejeződésének vizsgálata HUES9 őssejtek májirányú differenciációja során.....	43
4.3.1. Tenyésztőmédiumba kiválasztott humán albumin és urea meghatározása	43
4.3.2. Különböző májspecifikus markerek kifejeződésének vizsgálata immunfluoreszcens jelöléssel.....	45
4.4. A differenciáció során keletkező májsejtek érésének elősegítése a tenyésztési körülmények megváltoztatásával.....	47
4.5. A HUES9 őssejtek és a májirányú differenciáció során keletkező sejtek génkifejeződésének részletes vizsgálata TLDA-val, és összehasonlítása különböző kontroll mintákkal.....	48
4.6. Apikális és bazolaterális elhelyezkedésű membránfehérjék lokalizációjának és funkciójának vizsgálata különböző szendvics tenyésztési elrendezések között.....	58
4.7. GFP-vel címkézett különböző ABCG2 variánsokat stabilan kifejező genetikailag módosított HUES9 őssejtvonalak májirányú differenciációjának vizsgálata.	63
5. Összefoglaló	67
6. Summary.....	67
7. Köszönetnyilvánítás	68
8. Irodalomjegyzék	70

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

- AAT – Alpha-1-antitrypsin/ alfa-1-antitripszin
- ABC – ATP-binding cassette/ ATP kötő kazetta
- AFP – Alpha feto-protein/ alfa főtális fehérje
- ALB – Albumin/ albumin
- ARG1 – Arginase 1/ argináz 1
- BMP4 – Bone morphogenetic protein 4/ csont morfogenetikus fehérje 4
- BSA – Bovine serum albumin/ marha szérumalbumin
- BSEP – Bile salt export pump
- CDCFDA – 5(6)-karboxi-2',7'-diklorofluoreszcein diacetát
- CDH – Cadherin/ kadherin
- CFTR – Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7 másik neve)
- c- Myc – Proto-onkogén, sejtnövekedés, differenciálódás
- CXCR4 – C-X-C chemokine receptor type 4/ C-X-C kemokin receptor 4
- CYP – Cytochrome P450/ citokróm P450
- DAPI – 4',6-diamidino-2-phenylindole/ 4',6-diamidino-2-fenilindol
- DEX – Dexamethasone/ dexametazon
- DMSO – Dimethyl sulfoxide/ dimetil-szulfoxid
- DPBS – Dulbecco's Phosphate Buffered Saline/ Dulbecco-féle foszfátpuffer
- ECM – Extracellular matrix/ extracelluláris mátrix
- EdU – 5-ethynyl-2'-deoxyuridine
- EGF – Epidermal growth factor/ epidermális növekedési faktor
- EGFP – Enhanced GFP/ erősített GFP
- ELISA – Eenzyme-linked immunosorbent assay/ enzimkötött immunszorbens esszé
- FBS – Fetal bovin serum/ szarvasmarha embrionális szérum
- FGF2 – Fibroblast growth factor 2/ fibroblaszt növekedési faktor 2
- FOXA2 – Forkhead box protein A2
- G6PD – Glucose-6-phosphate dehydrogenase/ glükóz-6-foszfát dehidrogenáz
- GATA4 – GATA Binding protein 4/ GATA kötőfehérje 4
- GF – Growth factor/ növekedési faktor
- GFP – Green fluorescent protein/ zöld fluoreszcens fehérje
- GFR – Growth Factor Reduced/ növekedési hormon redukált
- GH – Growth hormone/ növekedési hormon

GSC – Goosecoid homeobox (definitív primitív endodermális marker)

GST – Glutathione S-transferase / glutation-S-transzferáz

GSTK1 – GST kappa 1 enzim

ES – Embryonic stem cell/ humán embrionális őssejt

HCM – Hepatocyte culture medium/ hepatocita fenntartó médium

HDL – High density lipoprotein/ nagy denzitású lipoprotein

HGF – Hepatocyte growth factor/ hepatocita növekedési faktor

HNF1 – Hepatocyte nuclear factor 1/ hepatocita nukleáris faktor 1

HNF4 – Hepatocyte nuclear factor 4 alpha/ hepatocita nukleáris faktor 4 alfa

HUES – Harvard University Embryonic Stem cell line

ICM – Inner cell mass/ belső sejtcsoport

IGF – Insulin-like Growth Factor/ inzulinszerű növekedési faktor

iPS – Induced pluripotent stem cell/ indukált pluripotens őssejt

Klf4 – Kruppel-like factor- 4/ Kruppel-szerű faktor 4

KRT – Keratin

KO-SR – Knockout serum replacement

LDHA – Lactate dehydrogenase A/ laktát dehidrogenáz A

MATE1 – Multidrug and toxin extrusion 1 transporter

MDR – Multidrug resistance/ multidrog rezisztencia

MEF – Mouse embryonic fibroblast/ egér embrionális fibroblaszt

MRP – Multidrug resistance-associated protein/ multidrog rezisztencia asszociált fehérje

NANOG – Nanog homeobox/ Nanog homeobox (pluripotencia marker)

NBD – Nucleotide binding domain – nukleotid kötő domén

ND – Not detectable/ nem detektálható

NIH – National Institute of Health/ Nemzeti Egészségügyi Hivatal (USA)

NEAA – Non-Essential Amino Acids/ nem esszenciális aminosavak

NTCP – Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide

OATP – Organic anion-transporting polypeptide

OCT1 – Organic cation transporter-1

OCT4 – Octamer-binding transcription factor 4/ oktamer-kötő transzkripció faktor 4

OSM – Oncostatin M/ onkostatin M

UPGMA – unweighted pair group method with arithmetic mean

PAS – Periodic acid-Schiff

PBS – Phosphate-buffered saline/ foszfát pufferelt sóoldat

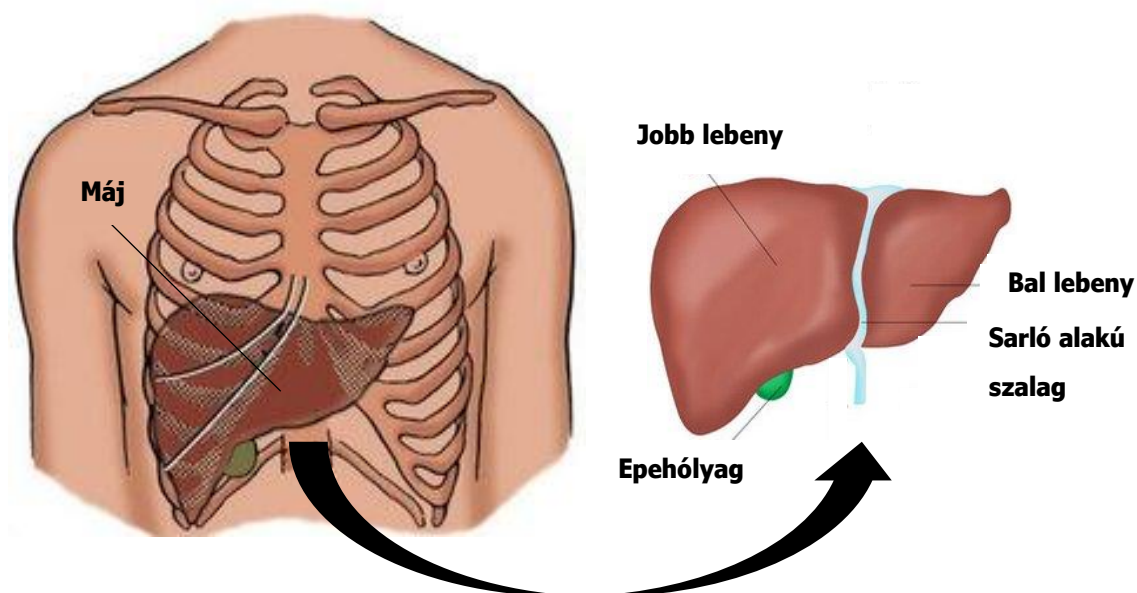
PC – Phosphatidylcholine/ foszfatidilkolin
PCA – Principal component analysis/ főkomponens analízis
PH – Partial hepatectomy/ parciális hepatektómia
POU5F1 – POU domain, class 5, transcription factor 1 (OCT4 kódoló gén)
qRT-PCR – Quantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction
RPLP0 – Ribosomal protein lateral stalk subunit P0/ riboszóma nagy alegység P0 tagja
RPMI 1640 – Roswell Park Memorial Institute 1640
SERPINA1 – AAT kódoló gén
SLC – Solute carrier
SOX2 – SRY (Sex-determining region Y) -Box Transcription Factor 2/ SRY-boksz 2
SOX17 – SRY-Box Transcription Factor 17/ SRY-boksz 17 (primitív endod. marker)
SW – Sandwich/ szendvics
T – Brachyury (mezodermális marker)
TAG – Triacylglycerol/ triacilglicerol
TAT – tyrosine aminotransferase/ tirozin aminotranszferáz
TDO2 – tryptophan 2,3-dioxygenase/ triptofán 2,3 deoxigenáz
TLDA – Taqman Low Density Array/ TaqMan alacsony denzitású array
TMD – Transmembrane domain/ transzmembrán domén
TUDCA – Tauroursodeoxycholic acid/ taurourszodeoxikolsav
WT – Wild type/ vad típusú

1. BEVEZETÉS ÉS IRODALMI ÁTTEKINTÉS

1.1. Az emberi máj felépítése és funkciója

1.1.1. A máj anatómiája és keringési rendszere

A máj az emberi szervezet legnagyobb mirigye és egyben az anyagcsere központja. A testen belül a hasüreg jobb oldalán helyezkedik el a csontos mellkasfal által fedve, a jobb hypochondriumot teljesen kitöltve és kissé átnyúlva a bal hypochondriumba (**1. ábra**). Sötétbarna, homológ megjelenésű szerv, amely anatómiailag egy nagyobb (jobb) és egy kisebb (bal) lebenyre osztható a köztük húzódó sarló alakú szalag mentén. Ezek a lebenyek azonban funkciójukat tekintve nem szétválaszthatók. A két lebeny között a máj alsó részén

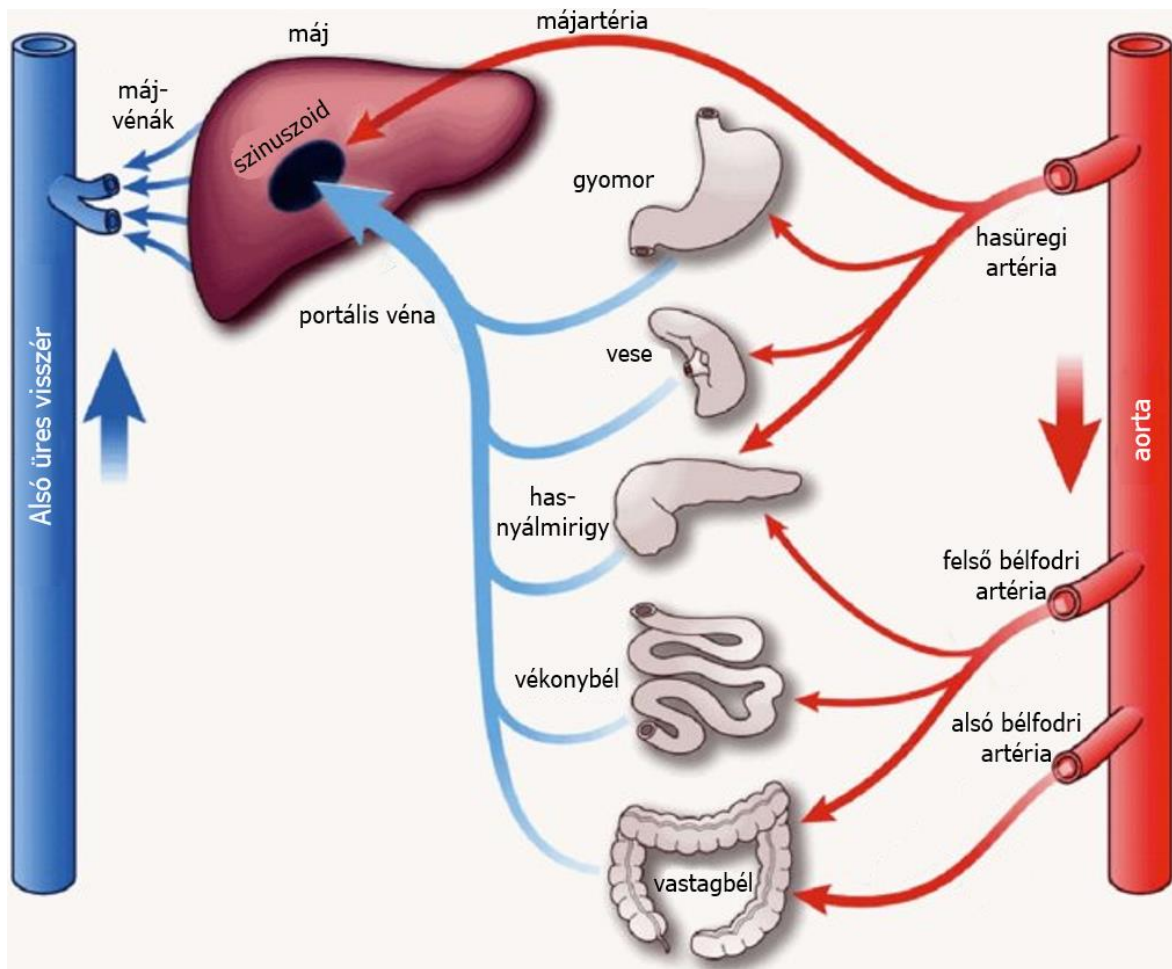


1. ábra A máj elhelyezkedése az emberben és a főbb anatómiai felosztása. Módosított ábrák, forrás:

<http://healthfixit.com/wp-content/uploads/2013/03/liver-anatomy-lines.jpg>

<http://www.ehealthstar.com/wp-content/uploads/2016/03/Liver-anatomy.jpg>

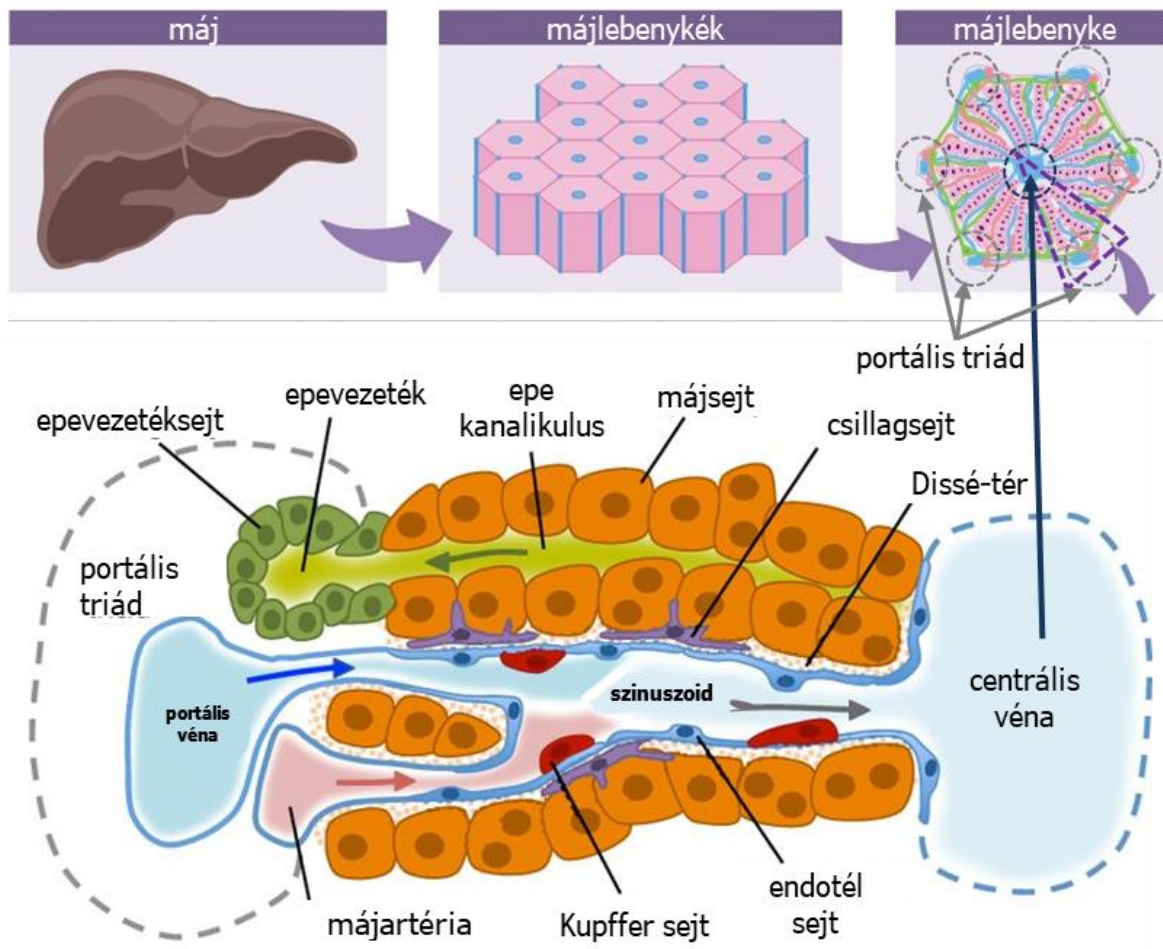
helyezkedik el az epehólyag, amely a máj által termelt epét raktározza. A májat számos kötőszöveti függesztő tartja a helyén és egy erős kötőszövetes tok, a Glisson-tok borítja be a teljes felszínét. A máj számos nagy érrel áll kapcsolatban és a vérellátása a többi szervhez képest egészen különleges. A szervbe a májartérián keresztül jut oxigéndús vér, ugyanakkor a belépő vérnek a többsége a portális vénán keresztül érkező oxigénben szegény vénás vér (**2. ábra**). A portális vénába gyűlik össze a tápcsatornából és a vesékből érkező vénás vér,



2. ábra A máj keringési rendszere. Az ábrán pirossal az oxigéndús arteriális, késsel pedig az oxigénszegény vénás vért szállító erek láthatók. Világosabb késsel a fontosabb hasüregi szervekből a májba érkező, a máj portális keringéséhez tartozó, vénás vért szállító erek láthatóak. A nyilak a vér folyási irányát jelölik. Módosított ábra, forrás:

Gelman S, Mushlin PS. Catecholamine-induced changes in the splanchnic circulation affecting systemic hemodynamics. *Anesthesiology* 2004, 100: 434-439).

amely így tápanyagokban és más makromolekulákban rendkívül gazdag. A különleges érzettség és a Glisson tokból származó kisebb, rugalmas kötőszövetes elemek osztják fel a szervet a legkisebb működési egységeinek tekintett májlebenykékre. Ezek a hatszögletű májlebenyék szabályos rendben, oszlopokban vagy gerendákban helyezkednek el egymás mellett (3. ábra). A májlebenyék hatszögeinek csúcsait a portális triád jelöli ki, amelyben



3. ábra A máj és a májlebenyék felépítése. Módosított ábrák, forrás:

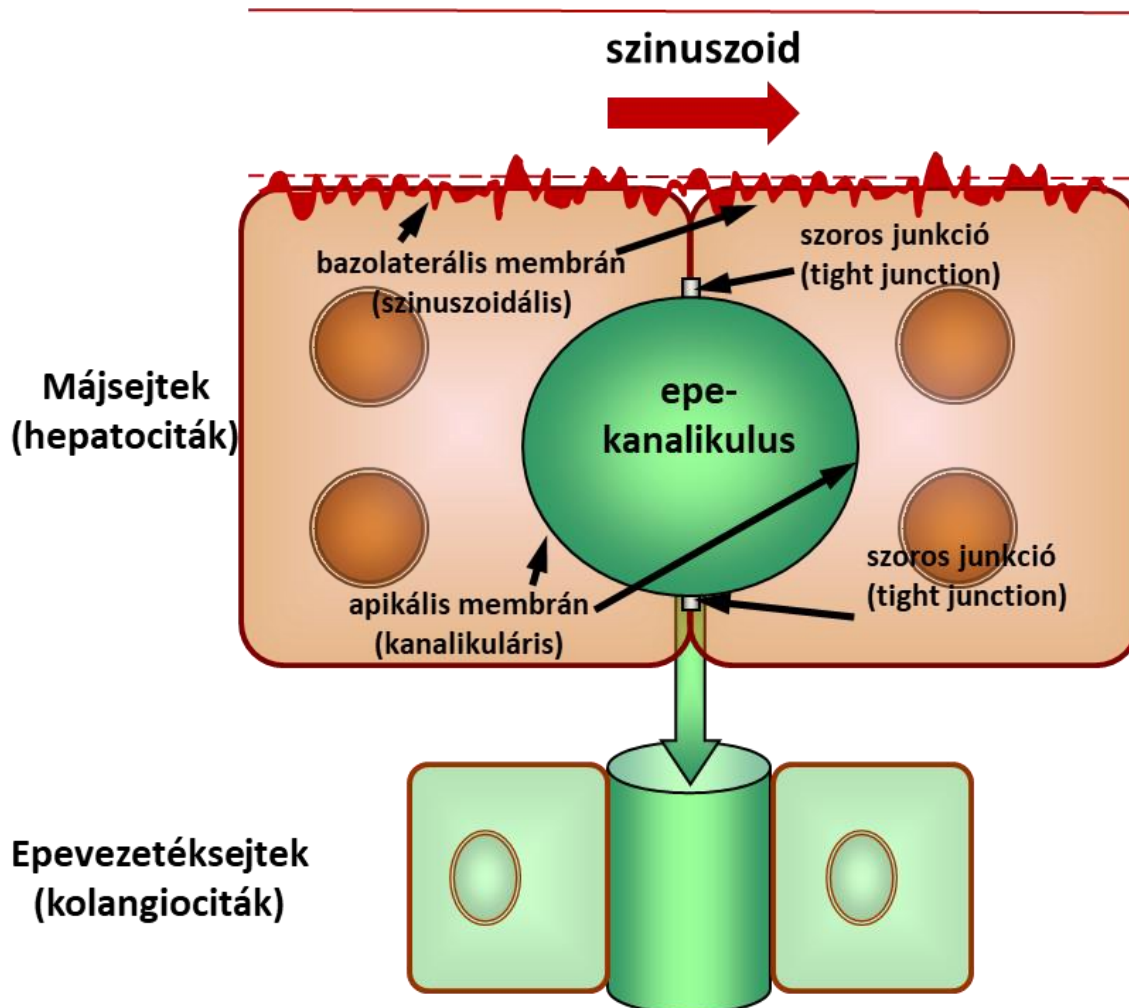
https://ib.bioninja.com.au/_Media/liver-lobule_med.jpeg és Miriam Gordillo et al. *Development* 2015;142:2094-2108

a portális vénából származó vért szállító, valamint az artériás vért szállító véredények és az epét szállító vezetékek szorosan egymás közelében helyezkednek el (3. ábra). Innen indulva, mind a vénás, mind az artériás vér a máj hajszálerein (szinuszoid) keresztül, egymással keveredve a centrális véna irányába folyik, amely egyben a májlebenyke közepét is jelöli. A centrális vénából a vér a májvénákon keresztül jut az alsó üres vénába, majd onnan a szívbe (2. ábra). A májszinuszoidok különleges, fenesztrált endotéliummal körülvett hajszálerek, amelyek lehetővé teszik a vér nem alakos elemeinek a májsejtekkel történő közvetlen kapcsolatát. A szinuszoidok mentén találhatóak a Kupffer sejtek, valamint a csillagsejtek is. A májsejtek és a szinuszoidok között alakul ki a Disse-tér, amely azonban csak ritkán alakul át valódi térré, például ha a nyirokerek nem tudják elszállítani a kóros mennyiségben termelődő szövetnedvet. A májsejtek az egymással érintkező felszínük mentén képzik az epekanalikulusokat, amelyekbe a májsejtekben termelődött epe kiválasztása történik. Az epe folyásának iránya ellentétes a vérével és a centrális véna felől

a portális triád irányába, a kisebb epevezetékekbe szállítódik. Innen az epe a nagyobb epeutakon keresztül végül az epehólyagban gyűlik össze, majd az epevezetéken keresztül a nyombélbe ürül.

1.1.2. A máj sejtípusainak és a májfunkcióknak az áttekintése

A májszövetet több sejtípus alkotja. A legnagyobb tömeget a májsejtek, vagy hepatociták adják, és a májtömeg ~70-85%-át teszik ki, valamint a legtöbb májra jellemző funkció ellátásáért is felelnek. A második leggyakoribb sejtípust az epevezetéksejtek adják, amelyek az epevezetékek falát, és ezáltal az epeutak nagy részét alkotják. Ezen sejteknek fontos szerepe van az epe összetételének szabályozásában (1). Kiemelten fontos szerepük van még szinuszoidok falát alkotó fenestrált endotélium sejteknek, amelyek biztosítják a vérből a mikro- és makromolekulák kiszűrődését a Dissé-térbe. Az immunrendszer sejtjei több formában vannak jelen a szöveten belül. A Kupffer-sejtek olyan májspecifikus makrofágok, amelyek fontos szerepet töltenek be a regenerációs folyamatok beindításában, és a különböző májfunkciók szabályozásában (2–4). Mellettük jelen vannak még különböző fenotípusú limfociták, dendritikus sejtek és a csillagsejt is. Utóbbi a Dissé-térbe benyúló hosszú sejtnyúlványú sejt, amely gyulladás esetén miofibroblasztta differenciálódik és extracelluláris mátrixot termel (ECM) (1,5,6). Fontos kiemelni, hogy a májsejtek polarizált sejtek, ami azt jelenti, hogy a sejtmembránjuk két jól elkülöníthető és funkciójukban eltérő résszel rendelkezik. Ennek a tulajdonságuknak nélkülözhetetlen szerepe van a normális működés fenntartásában. A sejtek bazolaterális, vagy szinuszoidális része a már korábban említett Disse-térrel van kapcsolatban és számos felületnövelő mikrobohollyal rendelkezik (**4. ábra**). Ez a vérben oldott anyagok felvételét és az abba történő anyagok leadását egyaránt segíti. Ezzel szemben helyezkedik el az apikális, vagy kanalikuláris felszínük, amit a szomszédos sejtek összeérő felszíne hoz létre. E struktúra kialakításában nagy szerepe van a különböző kapcsolófehérjéknek, amelyek együttesen a szoros jukció (tight junction) kialakításáért felelnek. Ezen felszínek között alakul ki az epecsatornácska vagy epekanalikulus, amely a májsejtek által termelt epét vezeti el az epevezetéksejtek által kialakított epeutakba. A szoros sejtkapcsolatnak köszönhetően nem tud keveredni egymással a vér és az epe, így többirányú jól szeparált anyagmozgás jöhet létre (1,7).



4. ábra A májsejtek membránpolarizáltságának sematikus ábrázolása.

A májszövet regenerációs képessége egyedülálló az emberi szervezetben. Sérülést követően ugyan a legtöbb szerv képes kisebb-nagyobb mértékben kompenzálni az elszennvedett károsodást, azonban a máj az egyetlen szerv, amely nagy részének (patkányokban kétharmad rész) eltávolítását (parciális hepatektómia [PH]) követően is képes visszaállítani eredeti tömegét, úgy hogy közben a funkciói nagy részét is képes ellátni (8,9).

A korábban ismertetett viszonylag egyszerű külső megjelenésével szemben a máj a szervezetben ellátott funkciói alapján az egyik legkomplexebb szervnek tekinthető. A máj az emberi szervezet legfőbb anyagcsereközpontja, szerteágazó feladatai közé tartozik a szénhidrát-, a fehérje- és a lipidanyagcsere szabályozása, de az epe-, vitamin- és a hormontermelés is. Számos véralvadási faktor és vérfehérje szintéziséért is felelős. Egyik legfontosabb funkciója a szervezetbe kerülő endo-, és xenobiotikumok eliminálása, a méregtelenítés. A táplálkozás során az emésztőrendszerben általában nagy mennyiségű szénhidrát szívódik fel, és jut a portális vénán keresztül a májba. Itt a májsejtek a fölösleget

vagy vízoldhatatlan glikogénné alakítják át (glikogenezis), amit elraktároznak, vagy zsírsavakat és aminosavakat szintetizálnak belőle (10). Amikor a szervezetnek glükózra van szüksége, de táplálékból nem jut elegendő mennyiséghez, akkor zajlik le a májban a glikogénolízis. Ebben a folyamatban a májsejtekben lévő glikogén alakul vissza glükózzá és kerül be a véráramba, ezzel fenntartva a normális vércukorszintet. Ha a szervezet sokáig nem jut megfelelő mennyiségű szénhidrát tartalmú tápanyaghoz, akkor éhezési anyagcserefolyamatokat aktivál, és a máj átáll a glükoneogenezis folyamatára. Ebben a folyamatban nem-szénhidrát előanyagokból (piroszőlősav, aminosavak stb.) állít elő cukrot a szervezet számára. Ez biztosítja éhezés során az idegrendszer számára a glükózsükségletet, amely a normál működésének a fenntartásához elengedhetetlen (10,11). A máj fentebb felsorolt három folyamat megfelelő működtetésével segít fenntartani az optimális vércukorszintet. A fehérjék szintézisének alapkövei az aminosavak, amelyek nagy része a felvett táplálékkal kerül be a szervezetbe, de a saját fehérjék bontásából, valamint a májban újonnan szintetizálva is képződhetnek (12). Az aminosavakból a máj számos vérplazmában jelen lévő plazmafehérjét (pl. alfa főtális fehérje [AFP] és albumin [ALB] ld. később), valamint véralvadási faktorokat (II, V, VII, IX, X, XI, XII faktorok; C és S protein) állít elő, illetve a kreatin, taurin és heparin szintézise is itt zajlik (1,13–15). A fehérjék lebontásában és az aminosav anyagcserében is jelentős szerepet vállal. Ezekhez a funkciókhoz társul az urea szintézise is, amely a fehérjék bontása során keletkező toxikus nitrogénvegyületek (pl. ammónia) kiürítését teszi lehetővé a szervezetből. A bontási folyamat során visszamaradó szénláncos vegyületeket pedig glükózzá, vagy ketontestekké alakítja át (16). A hemoglobin újrahasznosítása is a májban történik a bilirubin cikluson keresztül. A szervezetbe kerülő zsírsavak egy része lebomlik és triacilglicerol (TAG) cseppek formájában a májsejtekben raktározódik. Abban az esetben, ha a szervezetnek energiára van szüksége, akkor ezek a molekulák a szintén a májban képződő apolipoproteinek belsejében exportra kerülnek. A véráram segítségével eljutnak a szövetekhez, ahol lipolízis során alkotóelemeire bomlanak és *de novo* zsírsav-, vagy ketontestek szintézisében vehetnek részt (10). A máj a koleszterin anyagcsere központjaként is működik. Itt történik a koleszterin előállítás, és az emésztőrendszeren keresztül felvett koleszterin feldolgozása is. A koleszterin vegyület a biológiai membránok alapvető eleme, valamint az epesavak és számos hormon alapvázának is alkotója. Az alapvető biológiai szerepe ellenére fontos megemlíteni, hogy a sejtek nem képesek lebontani, viszont nagy mennyiségben mérgező hatású. A májsejtek az epesavak bioszintézise során képesek kiüríteni a toxikus koleszterint, ezzel normalizálva a szervezetben a szintjét. Az epének

fontos tulajdonsága, hogy detergens hatással bír, így az emésztésben megkerülhetetlen szerepet játszik (1,7). A máj fontos szereppel bír a szteroid és a polipeptid alapú hormonok anyagcseréjében. Az inzulin és az ösztrogén lebontás is itt zajlik. Emellett a szomatomedin, inzulinszerű növekedési faktor (IGF) termeléséért is a máj a felelős. Ennek a hormonnak a termelődését a növekedési hormon (GH) befolyásolja, és meghatározó szerepe van a normális növekedésben (17). A májban történik számos vitamin tárolása, például zsírszórban oldódó A-, D- és K-vitamin, valamint a vízoldékony B12-vitamin, is itt halmozódik fel. A D-vitamin nem csak raktározódik, de a 25-hidroxilációja (aktiválódása) is itt történik (1). A glikogén és a vitaminok tárolása mellett a vas raktározásában (ferritin) is kulcsszereplő a máj.

A szerteágazó anyagcsere és raktározási funkció mellett az egyik legfontosabb májfunkció a méregtelenítés. Az emésztőrendszerből, a hasnyálmirigyből és a lépéből a portális keringésen keresztül a májba jutó anyagokat a májsejtek veszik fel és a metabolizáló enzimszisztémájukon keresztül átalakítják. Ez a folyamat négy fázisra osztható. Az úgynevezett 0. fázishoz a sejtbe való bejutásért felelős rendszerek (felvevő [uptake] transzporterek), míg az I-es fázisba a felvett anyagokat oxidáló, hidrolizáló enzimek (pl. citokróm P450 [CYP]) tartoznak (1,18–21). Az I-es fázisban így olyan molekulák jönnek létre, amelyek reaktívabbak és a II-es fázisba tartozó metabolizáló enzimek (pl. glutation-S-transzferáz család [GST]) ezekre a metabolitokra olyan molekulákat kapcsolnak, amelyek megkönnyítik a sejtéből való eltávolításukat. Ezt a folyamatot III-as fázisnak nevezzük és az efflux transzporterek (lásd később) felelősek érte, amelyek elsősorban az epekanalikulusokba juttatják a nem kívánatos molekulákat (22–25).

1.2. A membrántranszporterek általános áttekintése és szerepük a különböző májfunkciókban

Az eukarióta, így az emberi szervezetet is alkotó sejtekben mindenütt membránok találhatók. Ezek választják el egymástól a különféle funkciókat ellátó sejtalkotókat, és felelősek a sejtben belüli és a sejtek közötti kontrollált anyagáramlás, valamint a kompartmentalizáció biztosításáért. A sejtben belüli (intracelluláris) és a sejtet körülvevő (sejt-, vagy plazma) membránok alapját a kettős lipidréteg adja, amelynek fő alkotóelemei a foszfo- glicerolipidek, valamint a szterolok közé tartozó koleszterin. Fiziológias esetben csak a zsírszórban oldékony molekulák képesek szabadon átjutni egy membránon keresztül, ugyanakkor a sejt homeosztázisának szabályozása és fenntartása miatt fontos más molekulák

átjutásának vagy átjuttatásának a biztosítása is. A transzportálódó molekulák a membránokban lévő fehérjéken, vagy fehérjekomplexeken keresztül jutnak át egyik térrészből a másikba. Ezek a folyamatok történhetnek passzívan, energiabefektetés nélkül valamilyen csatorna-, vagy szállítófehérjén keresztül (facilitált transzport), illetve aktívan, energiabefektetés mellett transzporterfehérjén keresztül. Minden sejt, így a májsejtek esetében is mind az aktív, mind a passzív típusú transzportfolyamatok fontosak, azonban az egyes májfunkciók ellátásában, mint például a méregtelenítés és az epe kiválasztás az aktív transzporterek a meghatározók. Szemben a szállítófehérjékhez kötött facilitált transzporttal, ahol általában a membrán két oldala közötti anyagkicserélődés folyamatát valamilyen molekula koncentráció grádiens hajtja (pl. a solute carrier [SLC] fehérjék zöménél), az aktív transzport legtöbbször a koncentráció grádiens mentén történik, és általában ATP hidrolízisből származó energia használódik fel a folyamat során. Azokat a fehérjéket, amelyek ATP hidrolízisből származó energiát használnak fel a működésük során transzport ATP-ázoknak nevezzük. Ezeknek a fő formái a P-típusú, F- és V-típusú, valamint az ABC típusú fehérjék. A májban az ABC (ATP binding cassette, ATP kötő kazetta) fehérjék szupercsaládjába tartozó transzporterek játszanak kulcsszerepet a már korábban említett méregtelenítési és epe kiválasztási folyamatokban, így a továbbiakban főleg ezekre a fehérjékre térek ki részletesebben. Az ABC fehérjékre jellemző, hogy ATP-t használnak fel a működésük során, amely az ABC doménhez, vagy más néven nukleotid kötő doménhez (nucleotide binding domain [NBD]) kötődik. Az elnevezésük is ebből a doménből ered, mert ez az összes ide tartozó fehérje esetében megtalálható (26). A humán genomban 48 ABC fehérjét kódoló gén található, és a fehérjéket A-G-ig 7 alcsaládba soroljuk, amelyek funkciója széles spektrumot fed le. Az E és F alcsaládba tartozó fehérjék például különböző jelátviteli folyamatokban, illetve feltehetőleg a fehérjeszintézis szabályozásában játszanak szerepet. A többi alcsalád nagy részét olyan ABC fehérjék teszik ki, amelyek feladatukat tekintve valamilyen anyag membránon keresztüli szállításáért felelős. Ezen fehérjéknek közös jellemzője, hogy az ABC domén mellett még transzmembrán domént vagy doméneket (TMD) is tartalmaznak. Az egyes alcsaládok tagjait a génszekvenciák alapján rendszerezzük. Az ABC fehérjék egy része aktív transzportot végző fehérje, amelynek legkisebb működési egysége két NBD és két TMD domén által alkotott dimer. A szervezeten belül rendkívül változatos szerepet töltenek be, köszönhetően a szubsztrátjaik széles választékának. Részt vesznek a lipid háztartás szabályozásában, szervetlen anionok, aminosavak és fehérjék, illetve hidrofób anyagok intracelluláris- és plazmamembránon

keresztüli transzportjában (27). Az ABC fehérjék legfontosabb jellemzőit az **1. táblázat** foglalja össze.

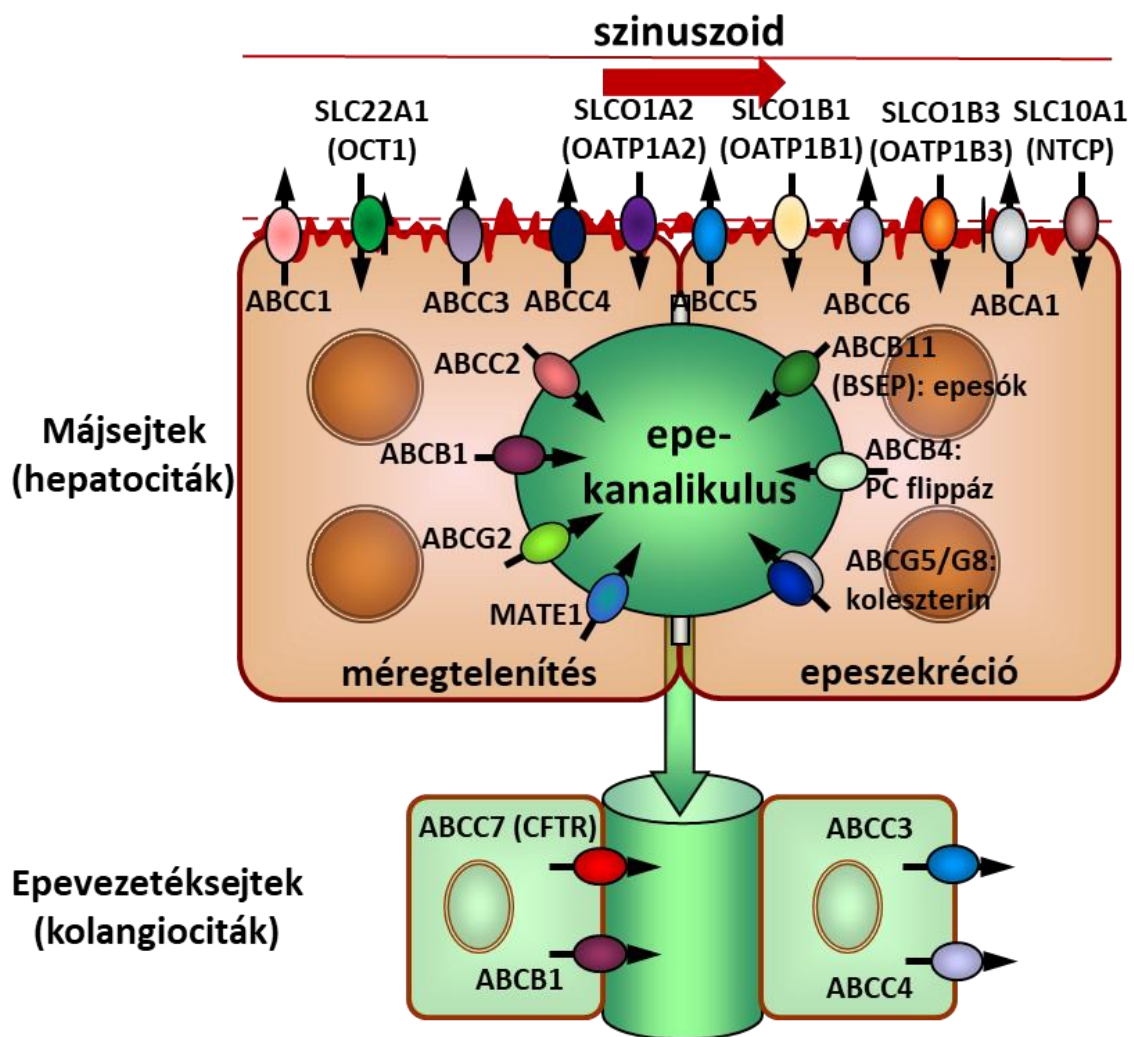
1. táblázat A humán ABC fehérjék legfontosabb jellemzői (26,28,29) alapján.

Alcslád	Név	Lokalizáció	Szöveti előfordulás	Szerep, lehetséges szubsztárt
ABCA	ABCA1	Plazmamembrán	Széles körű, máj	HDL biogenezis, glicero-fosfolipid vegyületek
	ABCA2	Plazmamembrán	Széles körű	lipid transzport?
	ABCA3	Plazmamembrán	Széles körű, tüdő hámszövetek	sufactant anyagok létrehozása
	ABCA4	Plazmamembrán	Retina	retinoid flippáz
	ABCA5	Lizoszóma	Széles körű	lipid szállítás
	ABCA6	Plazmamembrán	Széles körű	lipid homeosztázis
	ABCA7	Plazmamembrán	Széles körű	fagocitózis, foszfo- és ceramid lipidvegyületek
	ABCA8	Plazmamembrán	Széles körű	zsirolékony drogok transzportja?
	ABCA9	Plazmamembrán	Széles körű	lipid homeosztázis
	ABCA10	Plazmamembrán	Széles körű	lipid homeosztázis
	ABCA11	Plazmamembrán	Széles körű	lipid homeosztázis
	ABCA12	Plazmamembrán	Széles körű	lipid homeosztázis
ABCB	ABCB1 (MDR1)	Plazmamembrán	Széles körű, szöveti határok, rákos sejtek	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás
	ABCB2 (TAP1)	ER	Vér	antigén prezentáció, peptidok
	ABCB3 (TAP2)	ER	Vér	antigén prezentáció, peptidok
	ABCB4 (MDR3)	Plazmamembrán	Máj	Fosfolipid flippáz, lipidek
	ABCB5	Plazmamembrán	Széles körű	drogok
	ABCB6	Mitokondrium, lizoszóma	Széles körű	hem és porfirin transzport, fémionok transzportja?
	ABCB7	Mitokondrium	Széles körű	hem transzport
	ABCB8	Mitokondrium	Széles körű	fém és hem transzport
	ABCB9	Lizoszóma	Széles körű, here	antigén prezentáció, peptidok?
	ABCB10	Mitokondrium	Széles körű	hem transzport
ABCB11 (BSEP)	Plazmamembrán	Máj	epesavak szekréciója, epesavak	
ABCC	ABCC1 (MRP1)	Plazmamembrán	Széles körű, szöveti határok, rákos sejtek	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás, szerves anionok
	ABCC2 (MRP2)	Plazmamembrán	Széles körű, máj	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás, szerves anionok
	ABCC3 (MRP3)	Plazmamembrán	Széles körű, máj	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás, szerves anionok
	ABCC4 (MRP4)	Plazmamembrán	Széles körű, máj	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás, szerves anionok
	ABCC5 (MRP5)	Plazmamembrán	Széles körű, máj	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás, szerves anionok
	ABCC6 (MRP6)	Plazmamembrán	Széles körű, máj	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás, szerves anionok
	ABCC7 (CFTR)	Plazmamembrán	Széles körű, tüdő hámszövetek	kloridcsatorna
	ABCC8 (SUR1)	Plazmamembrán	Hasnyálmirigy	káliumcsatorna
	ABCC9 (SUR2)	Plazmamembrán	Símaizom, szívizom	káliumcsatorna
	ABCC10	Plazmamembrán	Széles körű	zsirolékony anionok transzportja
	ABCC11	Plazmamembrán	Széles körű	ösztradiol glükuronid transzport?
	ABCC12	Plazmamembrán	Széles körű	?
ABCD	ABCD1	Peroxiszóma	Széles körű	hosszú láncú zsírsavak transzportja, biogenezis
	ABCD2	Peroxiszóma	Széles körű	hosszú láncú zsírsavak transzportja, biogenezis
	ABCD3	Peroxiszóma	Széles körű	hosszú láncú zsírsavak transzportja, biogenezis
	ABCD4	Peroxiszóma	Széles körű	hosszú láncú zsírsavak transzportja, biogenezis
ABCE	ABCE1	Citoplazma	Széles körű	Rnáz L inhibitor
ABCF	ABCF1	Citoplazma	Széles körű	transzláció
	ABCF2	Citoplazma	Széles körű	transzláció
	ABCF3	Citoplazma	Széles körű	?
ABCG	ABCG1	Plazmamembrán	Széles körű, makrofág	lipid homeosztázis
	ABCG2	Plazmamembrán	Széles körű, szöveti határok, rákos sejtek	multidrog transzporter, széles szubsztárt specifikitás
	ABCG4	Plazmamembrán	Széles körű, makrofág	lipid homeosztázis
	ABCG5	Plazmamembrán	Máj, belek	szterol transzporter
	ABCG8	Plazmamembrán	Máj, belek	szterol transzporter

Néhány ABC transzporter széles szubsztártspecifikitással rendelkező, úgynevezett multidrog ABC fehérje (MDR). Ezek a fehérjék a kitüntetett szöveti határokon játszanak kulcsszerepet a sejtbe bekerülő, vagy ott termelődő anyagok eltávolításában. Fontos szerepük van a placenta, vér-agy és vér-here gát, a vese, a bélhámsejtek valamint a máj működésének ellátásában (30–32). Ezek az aktív pumpaként működő membránfehérjék számtalan

mérgező vegyületet transzportálnak ki a sejtekből, és az úgynevezett kemoimmun-rendszer tagjai, amely a konvencionális immunrendszer mellett egy másik fontos védelmi vonalat alkot (31). Sokszor ezek a transzporterek felelősek a kemoterápiás kezelések során kialakuló multidrog rezisztencia kialakulásáért, amely a rákos sejtek túlélését növeli, csökkentve ezzel a páciens túlélési esélyeit. A legfontosabb MDR fehérjék az ABCB1, ABCC1, és az ABCG2, amelyek mind megtalálhatóak a májsejtekben is.

A májsejtek polarizáltságának és a kialakult kompartmentek funkcióinak biztosításában kiemelt szerepe van a membrántranszportereknek (5. ábra). A Disse-tér felé



5. ábra A májsejtek és az epevezetéksejtek funkcióinak ellátásában fontos szerepet játszó membránfehérjék és azok jellemző elhelyezkedése. A nyilak a transzport folyamatok irányát jelölik.

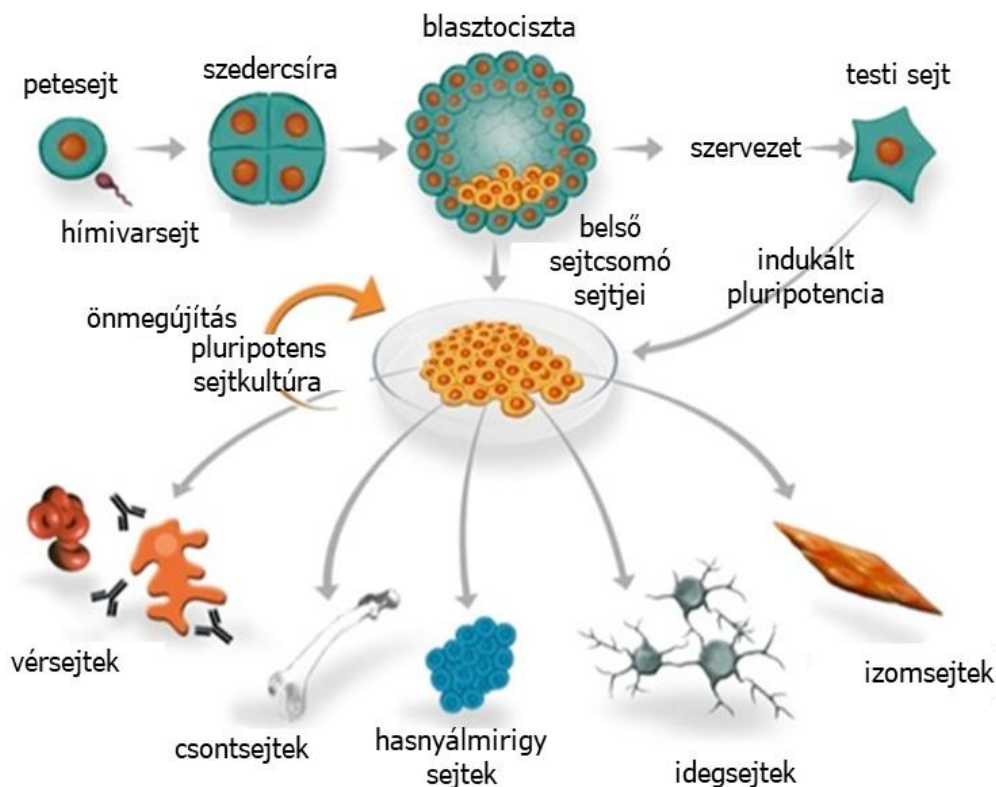
első bazolaterális membránban az egyik legjellemzőbb membránfehérje csoportot a solute carrier család tagjai alkotják. Az SLC10A1, vagy a Na⁺-taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP), egy nátrium ion függő uptake transzporter, amely az epesavak

májsejtbe juttatásáért felelős (18–20). Az egyirányú uptake transzporterek közé tartoznak az SLC01A2, SLC01B1 és 3 gén által kódolt organic anion-transporting polypeptide OATP1A2, OATP1B1 és OATP1B3 fehérjék, amelyek elsősorban a nagy nempoláris gyógyszer-molekulák és hormonok felvételéért felelősek, de az epesavak felvételében is szerepet játszanak (33–37). Mellettük az SLC22A1 gén által kódolt organic cation transporter-1 (OCT1) is kifejeződik a bazolaterális membránban. Az OCT1 egy polispecifikus, kétirányú transzporter, amely nem csak uptake, de efflux folyamatokban is részt vesz, ugyanakkor a májsejtekben főleg a felvevő funkciója dominál (38). Főként a korábban felsorolt transzporterek felelősek az 1.1.2. fejezetben már említett 0. fázisért a detoxifikációban. A bazolaterális membránban a másik jelentős csoportot az aktív efflux transzporterek adják. Ezek közül az ABCC fehérje alcsalád tagjai dominálnak, de fontos szerep hárul az ABCA1 fehérjére is. Utóbbi fehérje felelős a koleszterin és a foszfolipidek kipumpálásáért (reverz koleszterin transzport), amelyek aztán az apolipoproteinekre kerülve a naszcens high density lipoproteineket (HDL) alakítják ki. Az ABCC fehérjék közül az ABCC1 (MRP1), ABCC3-6 (MRP3-6) található meg a bazolaterális membránban és ezek egy része egyfajta biztonsági transzport rendszerként működik, amennyiben a mérgező vegyületek kipumpálása a kanalikuláris térbe nem bizonyul elégségesnek (22,39–42). Az apikális membránban az ABCB1 (MDR1), az ABCC2 (MRP2), az ABCG2 pumpa és az SLC47A1 transzporter (multidrug and toxin extrusion 1 [MATE1]; proton antiporter) felelősek a különböző endo és xenobiotikumok epeutakba történő kijuttatásáért, amely a III. fázisnak felel meg a korábban ismertetett méregtelenítési sémában (23–25,43). A máj egyik fő feladata az epe kiválasztása, amely szintén az apikális membránhoz és kizárólagosan az ABC transzporterek működéséhez köthető. Az ABCB11 vagy bile salt export pump (BSEP) fehérje felelős az epesók kanalikulusokba juttatásáért (44,45), míg az ABCB4 (MDR3) a foszfatidilkolin (PC) membrán külső oldalára történő kifordítását végzi, amely a foszfatidilkolin epébe történő kijutását eredményezi (46). Az ABCG5/G8 heterodimert alkotó fehérjepáros pedig feltehetőleg a koleszterin transzportjáért felelős az epekanalikulusokba (47,48). A májsejtek mellett az epevezetéksejtek is polarizált membránnal rendelkeznek. Itt is az apikális membrán érintkezik az epével, és az ABC fehérjék közül az ABCC7 (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator [CFTR]), valamint az ABCB1 (MDR1) jelenléte a jellemző. A bazolaterális oldalon főként az ABCC3-4 fehérjék találhatóak meg. Ezek az ABC fehérjék részt vesznek az epe összetételének szabályozásában (49,50).

1.3. Az emberi őssejtek típusai és felhasználási lehetőségei

Az őssejtkutatás egy fiatal tudományágnak tekinthető annak ellenére, hogy mára hatalmas ismeretanyaggal rendelkezünk e szerteágazó tudományterületen belül. Maga az őssejt fogalom már a 19. század végén és a 20. század elején megjelent, azonban a ma is használt definíció Lajtha Lászlótól és 1979-ből eredeztethető. A Lajtha féle meghatározás a vérképző rendszer őssejtjeiből indul, mely szerint az őssejtek olyan kolóniaképző sejtek, amelyek önfenntartásra és egy vagy több sejttypus, illetve sejtfejlődési sor létrehozására képesek. Ebből a definícióból már kikövetkeztethető, hogy az őssejteknek rendkívül fontos szerepük van az emberi szervezetben, mind az egyedfejlődés során, mind pedig később a regenerálódási folyamatokban. A természetes regeneráció során feltételezhetően az őssejtekből pótlódnak a folyamatosan pusztuló sejtek a szövetek számára, valamint a sérülések utáni regeneráció során is kulcsszerepük van a fiziológiás állapot helyreállításában. Az őssejtek két legjellemzőbb tulajdonságát, a korlátlan önmegújító és differenciálódási képességét az aszimmetrikus osztódás biztosítja, mely során létrehoznak egy olyan utódsejtet, amely a kiindulási őssejthez hasonló, valamint egy olyan utódsejtet is, amely egy „érettebb” differenciáltabb sejttypust képvisel. Az aszimmetrikus osztódási képesség teszi lehetővé, hogy a szövetekben mindig marad őssejt, mégis biztosítottak a regenerációs folyamatok.

Az egyedfejlődés során többféle őssejtet tudunk megkülönböztetni a differenciációs képességük alapján. Azt a sejtet, amely egy egész szervezet és az extraembrionális szövetek létrehozására is képes, totipotensnek nevezzük. Ilyen a megtermékenyített petesejt, a zigóta. Az ebből kialakuló hólyagsíra állapot során a belső sejtcsomó sejtjei (inner cell mass [ICM]) az úgynevezett pluripotens őssejtek. Ezen sejtek izolálásával lehet létrehozni az *in vitro* körülmények között fenntartható pluripotens embrionális őssejtvonalakat (ES) (6. ábra) (51).



6. ábra A humán pluripotens őssejtek létrehozásának változatai és az őssejtek fejlődési lehetőségei. A blasztociszta belső sejtcsozó sejtjeiből létrehozott sejt kultúrákat nevezzük embrionális őssejteknek (ESC). A testi sejtekből visszaprogramozott pluripotenciát mutató sejteket indukált pluripotens sejteknek nevezzük (iPS). Mindkét módszerrel előállított sejt kultúrából bármilyen testi sejt differenciálható. Módosított ábra, forrás:

https://4.bp.blogspot.com/-nncHCZjC-SY/WiYSed5q9MI/AAAAAAAAAGWI/C6l9E8PcVtwRTG0PPiioHBshH7mN9v2CMQCLcBGAs/s1600/ES_cell_regulation.jpg

Ezek a sejtek az extraembrionális szövetek (pl. méhlepény) kivételével bármilyen más testi sejté képesek differenciálódni. Ennél korlátozottabb átalakulási képességgel rendelkeznek a multipotens vagy szöveti őssejtek, amelyek csak egy csíravonal irányában elkötelezett sejteket, általában csak egy szövetre jellemző sejteket képesek létrehozni. Ilyenek például a már korábban említett vérképző (hematopoetikus) őssejtek is. A multipotens sejtek között megkülönböztetünk még oligopotens sejteket, amelyek többféle sejtípust létre tudnak hozni egy szöveten belül, vagy bipotens és unipotens sejteket is, amelyek kettő, vagy egyféle sejtípust létrehozására képesek. A 2006-es év nagy felfedezése volt, hogy egér testi sejtekből különböző mestergének kifejeztetésével (lásd később) létre lehet hozni pluripotens tulajdonságokkal rendelkező sejteket, melyeket indukált pluripotens őssejteknek (iPS) nevezünk (**6. ábra**) (52). Ezt később emberi sejtekkel is sikerül megismételni, még nagyobb lökést adva az őssejt-biológiai kutatásoknak (53,54). Ezért az úttörő felfedezésért Shinya Yamanaka 2012-ben Nobel díjat vehetett át.

Az őssejtek felfedezése és használata forradalmasította a biológiai kutatásokat. Orvosi és gyógyszerfejlesztési kutatások nagy számban foglalkoznak a terápiás felhasználási lehetőségekkel, valamint az alapkutatásban is kiváló lehetőségeket nyújtanak számos eddig nehezen modellezhető probléma megválaszolására. A különböző őssejtek különböző területeken bizonyulnak hasznosnak. A multipotens szöveti őssejtekkel végzett sikeres terápiás alkalmazások (pl. csontvelő transzplantáció) már több évtizedes múltra tekintenek vissza, de az ízületi porcok újjáépítésében, valamint egyéb más területeken is sikerrel alkalmazzák ezeket a sejteket (55–58). A totipotens sejteket elsősorban klónozási kísérletekben (59), valamint humán preimplantációs vizsgálatok során használják, amelyek elősegítik a súlyos genetikai betegségeket hordozó embriók kiszűrését, és segítségükkel fontos ismereteket lehet szerezni az emberi egyedfejlődés korai lépéseiről. A pluripotens őssejtek felhasználása rendkívül sokrétű. Az egér őssejtek segítségével különböző gén be- és kiütött egértörzseket lehet létrehozni, amelyek nagyban hozzájárulnak különböző betegségmodellek megalkotásához és patomechanizmusok feltárásához. Humán viszonylatban a pluripotens sejtek közül mind az ES, mind pedig az iPS sejtek felhasználása széles körű. A normál kariotípusú, egészséges sejtekből alapított ES vagy iPS sejtvonalak új távlatokat nyitnak meg a sejtbiológiai kutatásokban, mivel az eddig használt általában tumoros eredetű sejtmodellekkel szemben nem hordoznak kóros mutációkat, viszont jobban megtartják a fenotípusukat és szaporodási képességüket, mint a primer sejtek. Az ES sejtek létrehozásával kapcsolatban az etikai kérdések miatt a mai napig változatos szabályozási környezet van érvényben a világban. Ilyen sejtvonalak alapításához a mesterséges megtermékenyítés során feleslegessé vált, megsemmisítésre szánt hólyagcsíra állapotú embriók belső sejtcsomóját használják. Ez a fajta sejtvonala alapítás azonban nem mindenhol engedélyezett. Ennek ellenére jelenleg is 414 sejtvonala található a Nemzeti Egészségügyi Hivatal (National Institute of Health [NIH], Egyesült Államok) listáján, amelyek szabadon használhatók kutatási célokra, a világban pedig ennek a többszöröse elérhető (https://grants.nih.gov/stem_cells/registry/current.htm). Ezen embrionális őssejtvonala között számos olyan vonala található, amelyek kifejezetten egy betegséghez köthetők, így specifikus eszközt biztosítva azok tanulmányozására. Emellett az embrionális őssejtvonala a pluripotens őssejtek kutatásának a kiindulópontjai, és azóta is referenciaként szolgálnak. Az iPS sejtek létrehozásának kevesebb etikai aggálya van, mert ott egy testi sejtet programoznak vissza pluripotens állapotban, ezért napjainkra egyre nagyobb teret nyer az alkalmazásuk. A terápiás felhasználhatóság is kecsegtető az iPS sejtek esetében, mivel egy páciens testi sejtéből visszaprogramozott iPS sejtéből differenciáltatott sejtet

visszajuttatva, a páciensnél nem lép fel immun-összeférhetetlenség. Így megvalósulhat a kvázi saját sejt regenerációs terápia (60–62). Ugyanakkor érdemes megjegyezni, hogy a testi sejtek visszaprogramozása nem csak előnyökkel jár, hanem számos probléma is felmerül velük kapcsolatban. Az iPS sejtek létrehozása során a felnőtt szervezet egy érett sejtjébe, általában bőrsejtbe, valamilyen vírus közvetítő segítségével juttatják be a négy mesterszervi faktoroknak nevezett Kruppel-like factor 4 (Klf4), octamer-binding transcription factor 4 (Oct4), a proto-onkogén c-Myc, és a sex determining region Y-box 2 (Sox2) géneket. Ennek hatására a sejt „memóriája” törlődik és embrionális állapotba programozódik vissza. Ugyanakkor a visszaprogramozódás ellenére a sejt számos epigenetikai jellemzője és szomatikus mutációja megmarad, és az „életkora” sem változik. A genomba beépülő mesterszervi faktorok pedig szintén számtalan probléma forrásai lehetnek. A sejt „felnőtt” élete során szerzett epigenetikai memóriája, valamint az életkora negatívan befolyásolhatja a genetikai stabilitását és az iPS sejt vonalak hosszútávú fenntarthatóságát (63,64). A génbeviteli eljárások fejlesztésével, valamint a mesterszervi faktor genomba történő beépülésének megakadályozásával az általuk keletkező problémák egy része hatékonyan kivédhető. Ilyen megoldások lehetnek a nem integrálódó adeno-, adenoasszociált, vagy a Sendai vírusok alkalmazása (65–67). Ezen eljárások mellett az plazmid, transzpozon, mRNS, valamint fehérje alapú átprogramozási rendszereket is kidolgoztak (68–71). Összességében elmondható, hogy a testi sejtek visszaprogramozása nem túl hatékony és még jelenleg is költséges, valamint időigényes folyamat. A pluripotens sejtek közül ezért sok esetben az iPS sejtek használata nem indokolt és az embrionális őssejtek használata olcsóbb és célravezetőbb. Ilyen például az őssejt-differenciációs eljárások kidolgozása, valamint az általános toxikológiai modellfejlesztés, ami hosszú folyamat és az embrionális őssejtek potenciálisan stabilabb genetikai háttere erre nagyobb lehetőséget ad. Az így fejlesztett eljárásokat később könnyen lehet alkalmazni különböző iPS vonalakon is, időt és pénzt megtakarítva.

1.4. Májmodellek és májirányú őssejt-differenciációs eljárások

1.4.1. Májsejt modellek

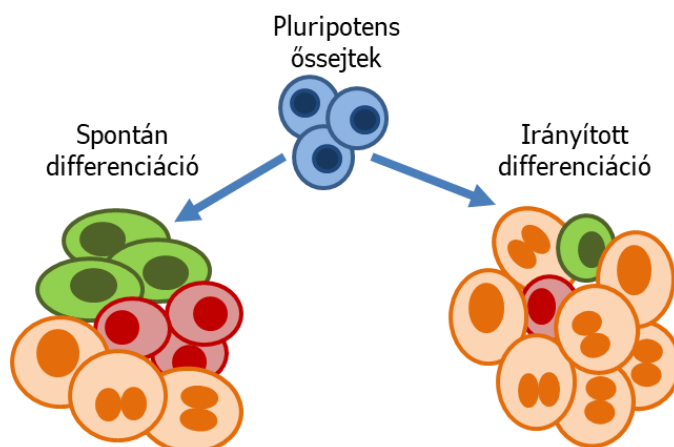
Ahogy a korábbi fejezetekből kiderül a máj létfontosságú szervünk és a megbetegedései komoly hatással vannak az emberi szervezetre. A kiváló regenerálódási potenciálja és a mérgező vegyületekkel szembeni toleranciája ellenére azonban korántsem sérthetetlen. A májbetegségek világszerte a vezető halálozási okok között szerepelnek

(72,73). Ezek egy része megelőzhető lenne donorszervek beültetésével, azonban a donorok száma jóval kevesebb a szükségesnél. Szintén problémát okoz, hogy helyettesítő kezelések is csak kis számban állnak rendelkezésre, amivel meg lehetne nyújtani a beteg élettartamát a megfelelő donorszerv megtalálásáig, ezért a terápiás módszerek fejlesztése kiemelten fontos. Az endogén és külső forrásból bejutott mérgeanyagok, illetve a gyógyszermolekulák feldolgozásában játszott szerepe miatt a toxikológia vizsgálatokban és a gyógyszer hatóanyag tesztelésben is fontos szerepet játszanak az *ex vivo* / *in vitro* májsejteken történő vizsgálatok. A szűkös hozzáférési lehetőségek miatt a májregenerációs kapacitásban rejlő lehetőségeket az orvostudomány igyekszik kiaknázni (9,74). Mivel egészséges májsejtekhez csak korlátozottan lehet hozzáférni (szervdonáció) csakúgy, mint a beteg májsejtekhez (műtéti minták), ezért általában májsejt modellsejteket használnak mind az alapkutatásokban, mind pedig az alkalmazott toxikológiai vizsgálatok során. Ezek a sejtek általában állati primer májsejtek (leggyakrabban egér vagy patkány), vagy pedig valamilyen tumoros eredetű sejtvonalak (HepG2, HuH-7, HepaRG). Mindkét opciónak megvannak az előnyei és a maga korlátai, ami miatt mérlegelni kell a használatukat. Az állati májsejtekhez viszonylag könnyű nagy mennyiségben hozzáférni, viszont az eltérő faji eredet miatt sokszor nem úgy viselkedik, mint a humán sejtek, így gyakran nagy költségek árán lehet korlátozottan felhasználható adatokhoz jutni (75,76). A tumoros eredetű sejtvonalak szintén nagy mennyiségben rendelkezésre állhatnak, azonban pont a rákos az eredetük miatt az ezekből nyert információk felhasználhatósága is limitált (21,77–79). Ezek mellett mind az állati, mind az emberi primer sejtek és a sejtvonalak esetében is fennállnak további nehézségek. A primer sejtek *in vitro* kultúrában hamar elveszítik a membránjaik polarizáltságát és speciális körülmények fenntartásával (pl. szendvics tenyészet) is csak viszonylag rövid időre lehet biztosítani azok fennmaradását és repolarizációját. Emellett szintén nehezítő körülmény, hogy a primer májsejtek nem osztódnak, így a kultúrákat csak egyszer lehet felhasználni, valamint a primer sejt kultúrák közötti biológiai variancia is nagy lehet. Ezek ellenére a toxikológiai vizsgálatokban még mindig a humán primer májsejtek használata jelenti a referenciát (80–85). A sejtvonalak esetében az osztódás kevésbé probléma, azonban vannak olyan sejtvonalak, amelyek nagyon lassú osztódási sebességgel rendelkeznek (HuH-7), vagy csak nem osztódóképes formában érhetők el (HepaRG). A legnagyobb probléma a sejtvonalakokkal kapcsolatban a polarizációs képesség korlátoltsága (2,9,21,86–88). Ezen sejtvonalak zöme nem képes teljes mértékben felvenni a májsejtekre jellemző polarizált felépítést, így szintén limitált az alkalmazhatóságuk toxikológiai vizsgálatokban. A humán pluripotens őssejtekből differenciáltatott májsejtek felhasználása

kiváló alternatív lehetőséget nyújt a májsejtek tanulmányozása és felhasználása terén, mert humán eredetűek és stabil genetikai háttérrel rendelkeznek. Az ES és iPS sejtekből létrehozott májmodellek sok esetben segíthetnek az *in vitro* toxikológia vizsgálatok során (89,90), valamint az iPS esetében az orvosi felhasználás is lehetséges az immunológiai összeférhetetlenség kikerülése miatt. Habár az így előállított sejtek kiváló felhasználhatósággal kecsegtetnek, a tényleges alkalmazáshoz még számos probléma megoldása szükséges (91). A pluripotens sejtek használatával számos nehezen vizsgálható májbetegség modellezése is lehetővé válik, ami a hagyományos sejtvonalak használatával a korábban már említett problémák miatt nehezen vizsgálható. A genetikailag módosított (pl. CRISPR-Cas9, vagy transzpozon alapú módosítások) pluripotens őssejtvonalakból előállított májsejtek használatával elvileg akármilyen májhoz kapcsolódó betegség tanulmányozására lehetőség nyílik. Az iPS sejtek esetében pedig egyenesen a betegből visszaprogramozott sejtek felhasználásával, akár személyre szabottan is lehet vizsgálni a betegség hátterét és kialakulását, valamint a lehetséges kezelését is (80,92).

1.4.2. Májirányú őssejt-differenciációs eljárások

A pluripotens sejtek korlátlan (az extraembrionális szövetek kivételével) differenciációs képességgel rendelkeznek. Ez *in vivo* teratóma képzéssel, *in vitro* pedig spontán differenciációs vizsgálatokkal igazolható. Az utóbbi folyamat során a sejteket pluripotens állapotban tartó környezet átalakítjuk, így azok spontán mindhárom csíravonal sejtjeivé differenciálódnak. A folyamat végére a spontán átalakulásnak köszönhetően egy teljesen vegyes sejt-kultúra alakul ki mindhárom csíravonalhoz tartozó sejtekkel (7. ábra) (93). Ezzel szemben a pluripotens sejtekből lehet irányított differenciációt is végezni, amely során úgy változtatjuk meg a környezetet, hogy egy adott csíravonalhoz tartozó sejtek átalakulásának kedvezzen, így a kívánt sejtek többségbe kerülnek kultúrában. A két módszer összehasonlításából látszik, hogy a spontán differenciációs eljárások kevésbé alkalmasak egy adott sejt-típus vizsgálatára, mert egy sejt-típusból arányaiban kevesebb képződik. Az irányított differenciációs eljárások fejlesztésével elvileg azt is el lehet érni, hogy egyféle sejt-típust domináljon az adott csíravonalon belül, így specifikusabb vizsgálatokat lehet végezni. Az első májirányú differenciációs vizsgálatok spontán differenciáción alapultak, amelyet aztán hamar felváltottak a bonyolultabb, de sokkal hatékonyabb irányított differenciációs protokollok (93,94). A legtöbb irányított differenciációs eljárás az adott sejt-, vagy szövettípus az egyedfejlődés során végbemenő kialakulását igyekszik modellezni.



7. ábra A pluripotens őssejtekből történő differenciáció két lehetséges módja. Spontán differenciáció esetén az őssejtek pluripotens állapotának fenntartásához szükséges körülményeket megszüntetjük, amelynek hatására a sejtekből mindhárom csírvonal sejtjei random keletkeznek. Irányított differenciáció esetén a tenyésztési körülményeket úgy változtatjuk, hogy a kívánt csírvonal és szövettípus sejtjei nagyobb arányban keletkezzenek, mint a többi csírvonal sejtjei.

Ez bár egyszerűen hangzik, azonban a legtöbb esetben nem áll elegendő információ rendelkezésre arról, hogy az emberben ez hogyan zajlik. A korai differenciációs eljárások ezért az állati embriogenezis vizsgálatai eredményeire hagyatkoztak. Az első irányított májirányú differenciációs protokollok megalkotásához a karmosbéka, zebrahal, csirke, valamint az egér és patkány modellek adták az alapot (95–98). Az ezeken alapuló differenciációs eljárások eredményeiből az ismeretek beépültek a ma is használatos többlépcsős irányított differenciációs eljárásokba. A protokollok zöme ma ugyanazokra a szakaszokra osztható. Első lépésként a pluripotens sejtekből definitív endoderma-képzés zajlik, majd következik a májirányú elköteleződés, korai májprogenitorok, vagy hepatoblaszt formálása, végül az éretlen és az érett májsejt állapotokba történő differenciálás következik. Az egyes stádiumokban a legtöbb eljárás különböző növekedési faktorok és kismolekulák kombinációit használja a differenciáció irányítására. Az endoderma formálás elősegítésére gyakran alkalmaznak Activin A, bone morphogenetic protein 4 (BMP4) és fibroblast growth factor 2 (FGF2) faktorokat. Az utóbbi két komponens használatával történik általában a májirányú elköteleződés indukálása is. A hepatocyte growth factor (HGF) fehérjével zajlik a májsejtek kialakulásának indukálása, amely után általában a dexamethasone (DEX) glükokortikoid és az oncostatin M (OSM) fehérje a leggyakrabban használt érést segítő molekula. Ezen faktorok mellett a különböző szakaszokban még számos jelátviteli utat blokkoló, vagy serkentő kismolekula alkalmazása is gyakori. A kísérletek megismételhetőségének szempontjából fontos olyan differenciációs környezet kialakítása, amely nem tartalmaz idegen fajból származó komponenseket. Ez az esetleges terápiás

felhasználás miatt is fontos lépés, ezért egyre több kutatás foglalkozik ezzel a területtel (91,99–102). Az eddig ismertetett lépések és komponensek az embriogenezis során lezajló rendkívül komplex, több csíralemez és fejlődő sejttípus által kialakított mikrokörnyezet változásokat, valamint kölcsönös egymásra hatásokat próbálják szimulálni (97,103). A folyamat bonyolultságára jellemző, hogy ugyan a májsejt-szerű sejtek aránya jelentősen megnő a differenciált kultúrákban, azonban azok érettsége sok szempontból elmarad az érett májsejtekhez képest (104,105). A májsejtek érésében, úgy ahogyan a működésükben is, kulcsszereplő lehet a háromdimenziós környezetük, beleértve a különböző sejt-sejt és sejt mátrix kapcsolatokat is. Ebből a megfontolásból az egyrétegű (monolayer) őssejt-differenciációs elrendezés helyett egyre jobban terjednek a háromdimenziós differenciációs környezet megalkotását szolgáló próbálkozások. Ehhez gyakran használnak különféle extracelluláris mátrixokat, 3D nyomtatott vázakat, vagy decellularizált szerveket. A kísérletek során gyakran kevernek a differenciált sejtek közé más sejttípusokat (endotél-, és mezenchimális sejteket), amelyekkel komplex organoidokat létrehozását célozzák meg (62,106–112). További kutatási irányt jelent az epesavak alkalmazása a keletkező májsejtek érésének elősegítésére, ugyanis kutatások igazolják, hogy a különböző epesavak (pl. tauroursodeoxikolsav [TUDCA]) elősegítik a májsejtek polarizációjának kialakulását (113–115).

1.4.3. Májirányú őssejt-differenciációs markerek

Az őssejteket és a belőlük keletkező utódsejteket többféleképpen lehet jellemezni. A morfológiai vizsgálatok önmagukban nem elégségesek, ezért legtöbbször specifikus gének kifejeződését szokták vizsgálni mRNS, vagy fehérje szinten. A differenciáció során a pluripotencia markerek közül a leggyakrabban a POU domain, class 5, transcription factor 1 (POU5F1) gén által kódolt OCT4, valamint a SOX2 és a homeobox NANOG gének kifejeződésének változását (csökkenését) szokták követni. Az endoderma irányú elköteleződést az SRY-Box Transcription Factor 17 (SOX17) és a Gooseoid Homeobox (GSC) gének kifejeződésének vizsgálatával lehet már a primitív endoderma állapottól a definitív endoderma állapotig követni. A májfejlődés korai szakaszában megjelenő gének közül a cadherin 1 és 2 (CDH1,2) a C-X-C chemokine receptor type 4 (CXCR4), a forkhead box protein A2 (FOXA2) és a GATA4 transzkripciós faktor kifejeződésének követése az általános. A májfejlődés későbbi szakaszainak jellemzésére több jól ismert májspecifikus gén kifejeződésének a követése az elfogadott. Az egyik sarokpont a hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4 α , a továbbiakban egyszerűen HNF4), amely egy transzkripciós faktor

fehérje, és kulcsfontosságú szerepet tölt be mind a májfejlődés során, mind az érett májsejtek differenciált állapotának fenntartásában (116–118). Szintén az ebbe a családba tartozó HNF1 transzkripciós faktor vizsgálata is gyakori. A különböző sejtvezetéksejt között is vannak olyanok, amelyek a kifejezetten májsejt, vagy epevezetéksejt specifikusak. Ezek közül a keratinok vizsgálata a legáltalánosabb. A májsejtek esetében a keratin 8 és 18 (KRT8, 18), az epevezetéksejtek esetében pedig a KRT7, 17 és 19 kifejeződésének a követése az általánosan bevett gyakorlat. A májsejtekkel kapcsolatban a plazmafehérjék szintézisének vizsgálata is elengedhetetlen. Az embrionális májsejtek által termelt AFP, valamint az embrionális májsejtek által már termelt, de főleg az érett májsejtekre jellemző albumin termelődésének követése kötelezőnek tekinthető a szakirodalomban (119,120). Az albumin szintjét gyakran kvantitatívan meghatározzák a sejtek felülűszójából is. Szintén gyakran előkerülnek a májirányú differenciációs vizsgálatokban a méregtelenítés fázis I és II enzimrendszer tagjai. Elsősorban a CYP enzimek kifejeződését, ritkábban az aktivitását vizsgálják mind az embrionális májsejtekre jellemző CYP7A1, mind pedig az érett májsejtekre jellemző CYP3A4 forma esetében. A GST enzimsalád tagjai képviselik általában a II fázis enzimeit, például a GST kappá 1 enzim (GSTK1). Gyakran előforduló markerek a szénhidrát háztartásban szerepet betöltő fehérjék is, mint például a glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PD), vagy a lactate dehydrogenase A (LDHA). Ehhez kapcsolódóan a glikogén raktározást periodic acid Schiff (PAS) festéssel szokták ellenőrizni, valamint a lipidcseppek jelenlétét is vizsgálják OilRedO festéssel. Az aminosav anyagcserében szerepet betöltő enzimek közül is számos fehérje kifejeződését vizsgálják, például a tyrosine aminotransferase (TAT), a tryptophan 2,3-dioxygenase (TDO2), vagy az arginase (ARG1) amely az urea háztartásban is szerepet játszik. Az urea termelődését általában a sejtek felülűszójából szokták meghatározni, amiből a sejtek funkcionális aktivitására lehet következtetni. A felsorolásban szereplő markereket az főként az alábbi publikációk felhasználásával állítottam össze (70,73,77,85,89,91,93,99,101–112,121–137).

A fentebbi felsorolásból látszik, hogy a májsejtek működésében betöltött fontos szerepük ellenére az ABC és más transzporterek kifejeződésének vizsgálatára idáig nem, vagy alig fordítottak figyelmet a májirányú differenciáció során kapott sejtek jellemzésénél. Az általunk vizsgált markereket a **3. táblázat** foglalja össze (lásd később).

2. CÉLKITŰZÉSEK

1. Humán pluripotens őssejtekből kiindulva többféle módszerrel lehet májirányú differenciálást végezni. Egy korábbi munkánk során feltártuk, hogy a különböző őssejtvonalak esetében – eltérő differenciációs képességük miatt – ugyanaz a differenciációs módszer különböző hatásfokkal működik. A vizsgált őssejtvonalak közül a HUES9 vonal bizonyult a legalkalmasabbnak a májirányú differenciációra (138). Mostani egyik célunk ezért az volt, hogy az irodalomban fellelhető leghatékonyabban működő eljárások közül kiválasztott protokollt hozzáigazítsuk az általunk használt humán embrionális őssejtvonalhoz.
2. Célul tűztük ki továbbá, a differenciációs folyamat során keletkező sejtek részletes jellemzését az irodalomban leggyakrabban alkalmazott morfológiai, génkifejeződési, valamint funkcionális tulajdonságok alapján. Ezek mellett kiemelten kívántuk vizsgálni a máj számos funkciójában kulcsfontosságú szereppel bíró transzporterek génkifejeződését, valamint kitüntetett figyelmet kívántunk fordítani több májmarker fehérjeszintű kifejeződésének és sejtbeli lokalizációjának vizsgálatára.
3. További célunk volt a differenciáció során keletkező májsejt-szerű sejtek érésének elősegítése. Megvizsgáltuk a két fedőréteg közötti, az úgynevezett szendvics tenyésztés; valamint egy epesav (TUDCA), illetve ezek kombinációinak hatását a génkifejeződésre, és több membránfehérje elhelyezkedésére a keletkező sejtekben.
4. Meg kívántuk vizsgálni az általunk használt májirányú differenciációs módszer alkalmazhatóságát genetikailag módosított őssejteken is. Ehhez olyan Sleeping Beauty transzpozonos rendszerrel létrehozott stabilan kifejező HUES9 sejtvonalak májirányú differenciációját végeztük el, amelyek EGFP-t, vagy GFP-vel címkézett vad típusú ABCG2 fehérjét kódoló gént, vagy az ABCG2-nek az R482G, vagy a K86M variánsát fejezték ki.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. A munkánk során használt sejtvonalak tenyésztése

3.1.1. A humán pluripotens őssejtek tenyésztése

A HUES9 humán embrionális őssejtvonalat a Harvard Egyetemről Douglas Melton laboratóriumából kaptuk. A sejtvonal fenntartását egér embrionális fibroblaszt sejteken (MEF) (Merck Millipore) végeztük. A MEF sejtek osztódását Mitomycin-C-vel (Sigma) gátoltuk meg, majd 6 lyukú tenyésztőlemezre tettük 4×10^4 sejt / cm^2 sűrűségben. Egy nap elteltével tettük a HUES9 sejteket a MEF sejtrétegre. A tenyésztő tápfolyadék 80% Knockout Dulbecco Modified Eagle Medium – KO-DMEM-ből állt (Thermo Fisher), amelyhez kiegészítőként 15% Knockout Serum Replacement –KO-SR (Thermo Fisher), 1 mM Glutamax-I (Thermo Fisher), 0,1 mM béta merkaptóetanol (Sigma), 1% nem-esszenciális aminosav (NEAA) (Thermo Fisher), valamint 4 ng/ml humán FGF2 (Thermo Fisher) került. A médiumot naponta cseréltük. Az őssejteket minden második nap új MEF sejtekkel fedett tenyésztőlemezre tettük úgy, hogy 0,05% tripszin-EDTA (Thermo Fisher) és KO-DMEM egy-egy arányú keverékével enzimatikusan elválasztottuk a két sejtípust egymástól. A tenyésztés 37°C -on 5% CO_2 jelenlétében, steril inkubátorban zajlott.

3.1.2. A HepG2 sejtvonal tenyésztése

A HepG2 (HB-8065) sejtvonalat az ATCC-től vásároltuk és DMEM/F12 (Thermo Fisher) 1:1 arányú tenyészőmédiumban tartottuk fent, amelyet 10% szarvasmarha embrionális szérummal (fetal bovine serum [FBS], Sigma), 200 mM L-glutaminnal (Thermo Fisher), valamint 1% penicillin/sztreptomycin (Thermo Fisher) antibiotikummal egészítettünk ki. A sejteket 25 cm^2 -es felületű tenyésztőedényekben tartottuk fent és 90%-os felület benövés esetén 0,1%-os tripszint (Thermo Fisher) használva, 1:4 arányban hígítva tettük át a sejteket új edényre. A tenyésztés 37°C -on 5% CO_2 jelenlétében, steril inkubátorban zajlott.

3.1.3. A HepaRG sejtek fenntartása

A HepaRG sejteket a Biopredic International cég biztosította számunkra. Ezek a sejtek humán májtumor eredetűek és máj progenitor sejtekre jellemző karakterrel bírnak. A kereskedelmi forgalomban azonban csak a nem osztódó, végső differenciációs állapotban lévő forma elérhető. A munkánk során mi is ezt a formát használtuk és a Biopredic

International által küldött anyagokat (sejtek, médiumok, tenyésztőlemezek) a cég instrukciói szerint használtuk.

3.1.4. A genetikailag módosított HUES9 sejtek fenntartása és differenciáltatása

A munkánk során használunk Sleeping Beauty transzpozonos rendszerrel létrehozott, genetikailag módosított HUES9 sejteket is. Az EGFP-t folyamatosan kifejező HUES9 sejtek létrehozását az (139), a GFP-vel címkézett vad típusú ABCG2-t, vagy az ABCG2 R482G, vagy K86M variánsát kifejező HUES9 sejtek létrehozását pedig a (92) közlemény részletezi. Ezen sejtvonalak tenyésztése és fenntartása a 3.1.1.-es pontban leírtak szerint történt, a differenciáltatását pedig a 3.2.3. pontban leírtak szerint végeztük.

3.2. Az embrionális őssejtvonalak májirányú differenciáltatása

3.2.1. Tenyésztő edények befedése Matrigellel

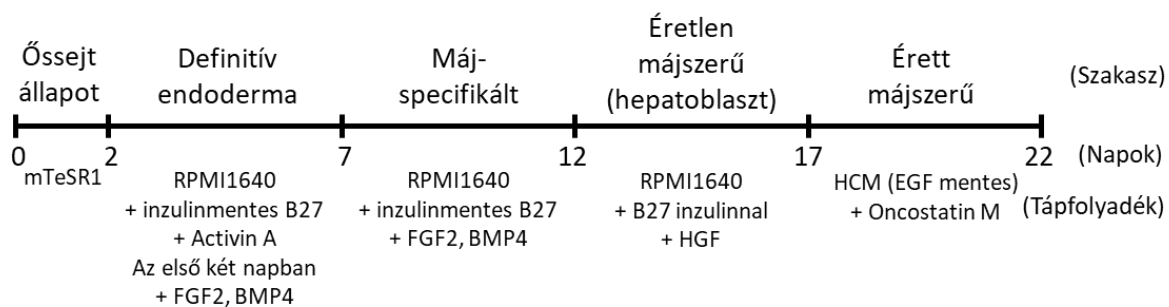
Az őssejt-differenciáció megkezdése előtt a 12 lyukú lemez (Corning) és Zellkontakt képkalkotó kamra (Zellkontakt) típusú tenyésztőedények alját 50 µg/ml koncentrációjú Matrigellel (Growth Factor Reduced Matrigel [GFR], BD Biosciences) vontuk be, majd 37 °C-on steril inkubátorban egy órán dermedni hagytuk, majd KO-DMEM tápfolyadékot mértünk rá.

3.2.2 Az őssejtek előkészítése a differenciációhoz

A MEF sejteken növesztett őssejteket steril Ca²⁺- és Mg²⁺-mentes Phosphate-buffered saline-nal (PBS, Thermo Fisher) átmostuk, majd a sejtkapcsolatokat Accutastal (Sigma) felbontottuk. Miután a sejtek elváltak egymástól, feleslegben adott tenyésztőmédiummal közömbösítettük az Accutast. Ezután a sejteket alacsony fordulatszámon (~70g) lecentrifugáltuk, majd centrifugacső aljára tömörödött sejteket MEF kondicionált médiummal (80% KO-DMEM, 2 mM GlutaMAX (Thermo Fisher), 0,1 mM béta merkaptotanol, 4 ng/ml FGF2 (Thermo Fisher), 48 óráig MEF sejteken tartva, majd 0,4 µm-es pórusú szűrőn átszűrve) felszuszpendáltuk, majd az előzőleg Matrigellel fedett tenyésztőedényekre ültettük ki 3x10⁵ sejt / cm² sűrűségben. Az edényeket 10 percenként, összesen 40 percig vízszintes és függőleges (x-y) irányban többször is megmozgattuk, a sejtek egyenletesen kitapadását elősegítendő. Végül mTeSR1 (Stem Cell Technologies) tápfolyadékban 37°C-on 5% CO₂ jelenlétében, pluripotens állapotban növesztettük a sejteket.

3.2.3. A májirányú differenciáció lépései

Az őssejtek általában 24-36 órával a kiültetés után érték el a differenciáció elindításához szükséges ~90%-os felület benövési állapotot (0-2 nap). A differenciációs protokoll (124,135) munkáin alapul, amelyet több apró módosítással alkalmaztunk a HUES9 sejt vonalak májirányú differenciációjához (**8. ábra**) (92).



8. ábra A differenciációs folyamat vázlatja az egyes szakaszok időtartamának és az alkalmazott tápfolyadékok összetételének feltüntetésével (88).

Első lépésként a definitív endoderma állapot felé toltuk el a sejtek elköteleződését, egy 5 napig tartó kétlépcsős folyamatban (2-7 nap). Az első lépcsőben az mTeSR1 tápfolyadékot Rosewell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640, Thermo Fisher) médiumra cseréltük, amely 2% inzulinmentes B27 (Thermo Fisher) 100 ng/ml Activin A, 10 ng/ml BMP4 és 20 ng/ml FGF2 (mindegyik Peptidech) kiegészítőket tartalmazott. Ebben a tápfolyadékban két napig nőttek a sejtek, majd a második lépcsőben elhagytuk a tápfolyadékból a BMP4 és FGF2 összetevőket és további 3 napig tenyésztettük a sejteket. A következő lépésben a keletkezett sejtek májirányú specifikálását végeztük el, úgy, hogy a sejtek 5 napon keresztül RPMI médiumot kaptak 2% inzulinmentes B27-tel, 20 ng/ml BMP4-gyel, valamint 10 ng/ml FGF2-vel (mindegyik Peptidech) kiegészítve (8-12 nap). A következő 5 napban (13-17 nap) hepatoblaszt indukálását végeztük RPMI alapú médiummal, amelyet 2%-os inzulint is tartalmazó B27-tel (Thermo Fisher), valamint 20 ng/ml humán rekombináns HGF (Peptidech) egészítettünk ki. A differenciáció utolsó szakaszában a májsejtek érését indukáltuk (18-22 nap) a tápfolyadék Hepatocyte Culture Media-ra cserélésével (HCM, Lonza), amely tartalmazta a 'Singlequots' összetevőket, kivéve az epidermal growth factor (EGF) komponenst, valamint kiegészítettük 20 ng/ml Oncostatin M-mel (Peptidech). A differenciáció összes szakaszában naponta cseréltük a tápfolyadékot, és steril inkubátorban 37°C-on 5% CO₂ mellett tenyésztettük a sejteket.

3.2.4. Két fedőréteg közötti (szendvics) tenyészetek készítése

A differenciációs folyamat 13. napján, a hepatoblaszt indukálás kezdetén készítettük el a Matrigel és 1-es típusú kollagén szendvics tenyészeteket. A kiválasztott mintákról a lefedés előtt eltávolítottuk a tápfolyadékot, majd vagy DMEM-ben oldott 1-es típusú kollagént- (0,325 mg/ml, BD Biosciences), vagy DMEM/F12 médiumban oldott GFR-Matrigelt (0,25 [SW], vagy 0,05 [SW 2] mg/ml) rétegeztünk a sejtekre. A kollagénnel fedett mintákat 30 percig, a Matrigellel fedett mintákat pedig 45 percig hagytuk dermedni, steril inkubátorban, 37 °C-on, majd ismét tenyésztőfolyadékot tettünk a sejtekre, és a továbbiakban ugyanúgy kezeltük, mint a nem lefedett mintákat.

3.2.5. Taurourszodeoxikolsav (TUDCA) kezelés

Az epesavak hatását a májirányú differenciációra TUDCA kezeléssel vizsgáltuk. A differenciáció utolsó 48 órájában (21-22 nap) a sejteken lévő tápfolyadékhoz dimetil szulfoxidban (DMSO, Sigma) oldott TUDCA-t (Sigma) adtunk 20 µM-os végkoncentrációban.

3.3. Sejtosztódási vizsgálatok

A HUES9 sejtek és belőlük differenciálódott májsejtek (21-22. nap) egy napra vetített osztódási kapacitását Click-iT Plus EdU képalpító kittel (Thermo Fisher) vizsgáltuk a gyártó utasításai szerint. A mintákról ImageXpress Micro (Molecular Devices) high content analysis berendezést használva készítettük a képeket és végeztük el azok analízisét.

3.4. A differenciáltatott sejtek funkcionális vizsgálata

3.4.1. Urea és albumin mérés

A differenciációs folyamat egyes szakaszainak végén, 24 órával az utolsó tápfolyadékcseré után, felülúszókat gyűjtöttünk a sejtekről. A mintákban meghatároztuk a szekretált humán albumin, mennyiségét egy enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) alapú humán albumin detektálására alkalmas esszével (Assaypro) a gyártó utasításai alapján. Kolorimetriás mérés alapján az urea koncentrációját szintén meghatároztuk a mintáinkban QuantiChrom DIUR-500 kitet (Gentaur) használva, szintén a gyártó utasításait követve. Ezzel párhuzamosan meghatároztuk azon sejt minták összes fehérje tartalmát, amelyekről a felülúszókat gyűjtöttük. Ehhez a sejt kultúrákból Laemmli-féle pufferrel mintát vettünk, majd Lowry-féle módszerrel meghatároztuk azok teljes fehérjetartalmát (140). A szekretált

albumin és urea mennyiségeket ezután normalizáltuk az egyes minták teljes fehérjetartalmára.

3.4.2. Az 5(6)-karboxi-2',7'-diklorofluorescein diacetát (CDCFDA) kipumpálásának vizsgálata

CDCFDA (Thermo Fisher) jelölést végeztünk Zellkontakt képalkotó kamrán szendvics kultúrában tenyésztett 22 napos (érett májszerű állapot) differenciáltatott sejteken, valamint HepG2 és HepaRG sejteken. A jelölés előtt a sejtekről eltávolítottuk a tenyésztő médiumot majd kétszer átmostuk a mintákat 37°C-ra előmelegített PBS-el. Ezután 2µM CDCFDA-t tartalmazó szérumentes médiumban 30 percig 37°C-on inkubáltuk, majd a képalkotás előtt újból kétszer átmostuk előmelegített PBS-el a mintákat, és fenolvörös mentes széndioxid independens médiumban (Thermo Fisher) végeztük a méréseinket. A képeinket Leica DM IL widefield fluoreszcens mikroszkópon készítettük, HCX PL Fluotar 40× (0.75) levegő immerziós objektívet használva. A képek analíziséhez a Fiji programot használtuk.

3.5. Immuncitokémiai vizsgálatok

A munkánk során Zellkontakt képalkotó kamrákon differenciáltatott sejtekből, valamint HepG2 és HepaRG sejtekből készített mintákon végeztünk immunfluoreszcens jelöléssel vizsgálatokat. A képalkotó kamrákat a 3.2.1.-es pontban leírtak szerint kezeltük, illetve a szendvics tenyészeteket a 3.2.4-es pontban leírtak szerint hoztuk létre. A differenciációs folyamat minden szakaszának végén 4%-os PBS-ben oldott paraformaldehid (PFA) oldattal, 15 percig szobahőmérsékleten fixáltuk a mintákat, majd jéghideg metanollal 15 percen keresztül permeabilizáltuk a sejteket. Ezután háromszor átmostuk a sejteket Dulbecco-féle foszfátpufferrel (DPBS), majd egy órán keresztül blokkoltuk a mintában található ellenanyag-kötőhelyeket komplett blokkoló oldattal (2 mg/ml bovine serum albumin (BSA), 1 % halzselatin, 0,1 % Triton X-100 (mind Sigma) és 5 % kecskeszérum (Thermo Fisher) DPBS-ben oldva és pH 7,2-re beállítva). A következő lépésben az egyes mintákat komplett blokkoló oldatban hígított elsődleges ellenanyaggal vagy ellenanyagokkal (**2. táblázat**) együtt inkubáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Ezt követően háromszor átmostuk a mintákat DPBS-el, majd a megfelelő másodlagos ellenanyagokat (**2. táblázat**) komplett blokkolóban oldva újabb 1 órát inkubáltuk. Ezután 1 órát mostuk a mintákat DPBS-el 20 percnél cserélve a folyadékot, majd 10 percig 1µM DPBS-ben oldott 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI, Sigma) oldattal, szobahőmérsékleten

megfestettük a sejtmagokat. Újabb háromszori DPBS-el történő mosás után Olympus FV500-IX (Olympus), vagy Zeiss LSM710 konfokális lézer pásztázó mikroszkópos rendszeren 60x (1,4) olaj-, vagy 20x (0,8) levegő immerziós objektívet használva készítettük el a felvételeinket. A képek analíziséhez és hamisszínezéséhez Fiji programot használtunk.

2. táblázat Az immunfluoreszcens festésekhez használt ellenanyagok listája

Elsődleges ellenanyag	Gyártó / Katalógusszám	Biológiai eredet / klonalitás	Hígítás	Másodlagos ellenanyagok (ThermoFisher)	Hígítás
anti GFP	AVES / GFP-1020	csirke / poliklonális	1:250	AlexaFluor-488 jelölt anti-csirke IgY	1:250
anti humán ABCG2	BD Bioscience / 552823	egér / monoklonális	1:250	AlexaFluor-488 jelölt anti-egér IgG	1:250
anti humán AFP	Abcam / ab3980	egér / monoklonális	1:200	AlexaFluor-488 jelölt anti-egér IgG	1:250
anti humán Albumin	Abcam / ab10241	egér / monoklonális	1:500	AlexaFluor-488 jelölt anti-egér IgG	1:250
anti humán Claudin 5	Invitrogen / 35-2500	egér / monoklonális	1:120	AlexaFluor-594 jelölt anti-egér IgG	1:250
anti humán HNF4 α	Abcam / ab92378	nyúl / monoklonális	1:100	AlexaFluor-594 jelölt anti-nyúl IgG	1:250
anti humán KRT18	Abcam / ab7797	egér / monoklonális	1:100	AlexaFluor-488 jelölt anti-egér IgG	1:250
anti humán KRT19	Abcam / ab52625	nyúl / monoklonális	1:250	AlexaFluor-594 jelölt anti-nyúl IgG	1:250
anti humán MRP2	Abcam / ab3373	egér / monoklonális	1:20	AlexaFluor-488 jelölt anti-egér IgG	1:250
anti humán NTCP	Abcam / ab52625	nyúl / poliklonális	1:100	AlexaFluor-594 jelölt anti-nyúl IgG	1:250
anti humán Occludin	Invitrogen / 33-1500	egér / monoklonális	1:200	AlexaFluor-594 jelölt anti-egér IgG	1:250

3.6. Génkifejeződések vizsgálata kvantitatív valós idejű PCR-rel (qPCR)

A különböző mintákból 1 ml TRIzol reagenst (Thermo Fisher) használva teljes RNS-t izoláltunk a gyártó utasításai szerint. NanoDrop 2000 Spectrophotometer (Thermo Fisher) készülékkel megmértük az RNS koncentrációját, valamint ellenőriztük a tisztaságát. Az általunk izolált RNS-ek mellett, kereskedelmi forgalomban kapható humán embrionális, valamint felnőtt májmintákból (Agilent) származó RNS mintákat is felhasználva, 1 μ g teljes RNS-ből kiindulva SuperScript VILO kit (Thermo Fisher) felhasználásával a gyártó utasításai szerint végeztük a cDNS átírást. A mintákat Debrecenben az UD-GenoMed Kft. segítségével megfuttattuk egy általunk tervezett és gyártatott 384 lyukú TaqMan Low-Density Array (TLDA) kártyán (Thermo Fisher), ABI Prism 7900HT készüléket és TaqMan Fast Advanced Master Mix-et használva a gyártó utasításai szerint. A qPCR-ben alkalmazott próbák a **3. táblázat**ban találhatóak. A gének kifejeződését az 5 legstabilabban kifejeződő háztartási gén átlagára normalizáltuk (141) (dCt módszer; $dCt_x = C_{t_x} - C_{t_{Ref}}$). A relatív

génkifejeződési értékeket ddCt módszerrel, a szintváltozásokat pedig a 2^{-ddCt_x} képlettel számoltuk ki. A dCt értékeket felhasználva főkomponens analízist (PCA), valamint klaszteranalízist (unweighted pair group method with arithmetic mean [UPGMA] algoritmus) végeztünk, (142) PAST szoftvert használva (143). Az analízisekben két TLDA futás átlagának az eredményeit szerepeltetjük. Minden TLDA futtatás két technikai ismétléssel zajlott és futásonként két biológiai párhuzamossal dolgoztunk. A CYP3A4 (assay ID: Hs00604506_m1) expressziós szintjeinek meghatározása külön mérés során zajlott. Ebben az esetben egy TLDA futtatás történt két biológiai párhuzamosból gyűjtött cDNS mintán. A kiértékelést a korábban leírt módszerek szerint végeztük. Egyedi qPCR méréseket is végeztünk a HNF4, AFP, ALB, ABCG2, ABCB11 és az RPLP0 mRNS szintjeinek meghatározására, ugyanazokat az próbákat használva, mint a TLDA kártyán (2. táblázat, kivéve RPLP0: Hs99999902_m1). A futtatáshoz StepOnePlus real-time PCR rendszert (Life Technologies) és TaqMan Fast Advanced Master Mixet (Thermo Fisher) használtunk a gyártó utasításai szerint. A relatív mRNS szinteket a 2^{-dCt} módszer szerint számoltuk az RPLP0-t belső kontrollként használva.

3. táblázat A qPCR reakciókban vizsgált gének és az alkalmazott próbák listája

A vizsgált génekhez tartozó próbák	A vizsgált gének hivatkozott neve	A vizsgált gének hivatalos angol neve	Marker típusa
B2M-Hs00984230_m1	B2M	beta-2-microglobulin	háztartási gén
ACTB-Hs01060665_g1	ACTB	actin, beta	háztartási gén
GAPDH-Hs02786624_g1	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	háztartási gén
TBP-Hs00427620_m1	TBP	TATA box binding protein	háztartási gén
GUSB-Hs99999908_m1	GUSB	glucuronidase, beta	háztartási gén
POLR2A-Hs01108284_g1	POLR2A	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide A, 220kDa	háztartási gén
PPIA-Hs04194521_s1	PPIA	peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)	háztartási gén
GAPDH-Hs99999905_m1	GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	háztartási gén
RPLP0-Hs99999902_m1	RPLP0	Ribosomal protein lateral stalk subunit P0	háztartási gén
SOX2-Hs01053049_s1	SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2	össejt
NANOG-Hs02387400_g1	NANOG	Nanog homeobox	össejt
POU5F1-Hs00999632_g1	POU5F1	POU class 5 homeobox 1	össejt
SOX1-Hs01057642_s1	SOX1	SRY (sex determining region Y)-box 1	ektoderma
PPARA-Hs00947539_m1	PPARA	peroxisome proliferator-activated receptor alpha	mezoderma
T-Hs00610080_m1	T	T, brachyury homolog (mouse)	mezoderma
SOX17-Hs00751752_s1	SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17	endoderma
CDH2-Hs00983056_m1	CDH2	cadherin 2, type 1, N-cadherin (neuronal)	májprogenitor
CDH1-Hs01023894_m1	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)	korai máj
CXCR4-Hs00607978_s1	CXCR4	chemokine (C-X-C motif) receptor 4	korai máj
FOXA2-Hs00232764_m1	FOXA2	forkhead box A2	korai máj
GATA4-Hs00171403_m1	GATA4	GATA binding protein 4	korai máj
GSC-Hs00418279_m1	GSC	gooseoid homeobox	korai máj
KRT7-Hs00559840_m1	KRT7	keratin 7	epevezetéksejt
KRT17-Hs01588578_m1	KRT17	keratin 17	epevezetéksejt
KRT19-Hs00761767_s1	KRT19	keratin 19	epevezetéksejt
ATP8B1-Hs00900656_m1	ATP8B1	ATPase, aminophospholipid transporter, class I, type 8B, member 1	májsejt
AFP-Hs00173490_m1	AFP	alpha-fetoprotein	májsejt
ALB-Hs00910225_m1	ALB	albumin	májsejt
ASGR1-Hs00155881_m1	ASGR1	asialoglycoprotein receptor 1	májsejt
CEBPA-Hs00269972_s1	CEBPA	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), alpha	májsejt
CYP1A1-Hs01054797_g1	CYP1A1	cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1	májsejt
CYP3A7-Hs00426361_m1	CYP3A7	cytochrome P450, family 3, subfamily A, polypeptide 7	májsejt
CYP7A1-Hs00167982_m1	CYP7A1	cytochrome P450, family 7, subfamily A, polypeptide 1	májsejt
G6PD-Hs00166169_m1	G6PD	glucose-6-phosphate dehydrogenase	májsejt
GSTK1-Hs01114170_m1	GSTK1	glutathione S-transferase kappa 1	májsejt
HNF1A-Hs00167041_m1	HNF1A	HNF1 homeobox A	májsejt
HNF4A-Hs00604435_m1	HNF4A	hepatocyte nuclear factor 4, alpha	májsejt
KRT8-Hs01630795_s1	KRT8	keratin 8	májsejt
KRT18-Hs01653110_s1	KRT18	keratin 18	májsejt
LDHA-Hs00855332_g1	LDHA	lactate dehydrogenase A	májsejt
SERPINA1-Hs01097800_m1	SERPINA1	serpin peptidase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, AAT), 1	májsejt
TAT-Hs00356930_m1	TAT	tyrosine aminotransferase	májsejt
TDO2-Hs00194611_m1	TDO2	tryptophan 2,3-dioxygenase	májsejt
ARG1-Hs00968979_m1	ARG1	arginase 1	májsejt (urea)
CYP51A1-Hs01567880_g1	CYP51A1	cytochrome P450, family 51, subfamily A, polypeptide 1	májsejt (urea)

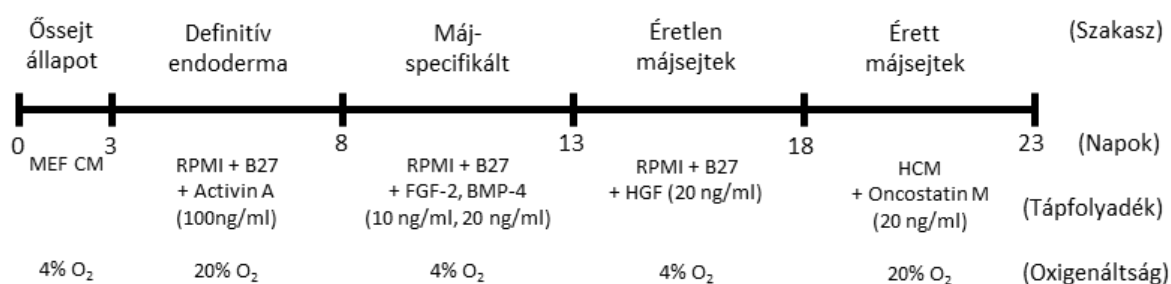
3. táblázat A qPCR reakciókban vizsgált gének és az alkalmazott próbák listája (folytatás)

A vizsgált génekhez tartozó próbák	A vizsgált gének hivatkozott neve	A vizsgált gének hivatalos angol neve	Marker típusa
ABCA1-Hs01059103_m1	ABCA1	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	ABC fehérje
ABCA2-Hs00242232_m1	ABCA2	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 2	ABC fehérje
ABCA3-Hs00975530_m1	ABCA3	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 3	ABC fehérje
ABCA4-Hs00184367_m1	ABCA4	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 4	ABC fehérje
ABCA6-Hs00365329_m1	ABCA6	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 6	ABC fehérje
ABCA7-Hs01105117_m1	ABCA7	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 7	ABC fehérje
ABCA8-Hs00992371_m1	ABCA8	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 8	ABC fehérje
ABCA9-Hs00329320_m1	ABCA9	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 9	ABC fehérje
ABCA10-Hs01107881_m1	ABCA10	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 10	ABC fehérje
ABCA12-Hs00292421_m1	ABCA12	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 12	ABC fehérje
ABCB1-Hs00184500_m1	ABCB1	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1	ABC fehérje
ABCB2;TAP1-Hs00388677_m1	ABCB2	transporter 1, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	ABC fehérje
ABCB3;TAP2-Hs00241060_m1	ABCB3	transporter 2, ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP)	ABC fehérje
ABCB4-Hs00240956_m1	ABCB4	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 4	ABC fehérje
ABCB5-Hs02889060_m1	ABCB5	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 5	ABC fehérje
ABCB6-Hs01039213_m1	ABCB6	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 6	ABC fehérje
ABCB7-Hs00188776_m1	ABCB7	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 7	ABC fehérje
ASIC3;ABCB8-Hs00185159_m1	ABCB8	acid-sensing (proton-gated) ion channel 3 (ABCB8)	ABC fehérje
ABCB9-Hs00608640_m1	ABCB9	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9	ABC fehérje
ABCB10-Hs00429240_m1	ABCB10	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 10	ABC fehérje
ABCB11-Hs00184824_m1	ABCB11	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 11	ABC fehérje
ABCC1-Hs00219905_m1	ABCC1	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 1	ABC fehérje
ABCC2-Hs00166123_m1	ABCC2	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 2	ABC fehérje
ABCC3-Hs00358656_m1	ABCC3	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 3	ABC fehérje
ABCC4-Hs00988717_m1	ABCC4	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 4	ABC fehérje
ABCC5-Hs00981087_m1	ABCC5	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 5	ABC fehérje
ABCC6-Hs00184566_m1	ABCC6	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 6	ABC fehérje
ABCC7;CFTR-Hs00357011_m1	ABCC7	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (ABCC7)	ABC fehérje
ABCC8-Hs01093761_m1	ABCC8	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 8	ABC fehérje
ABCC9-Hs00245832_m1	ABCC9	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 9	ABC fehérje
ABCC10-Hs00375701_m1	ABCC10	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 10	ABC fehérje
ABCC11-Hs01090768_m1	ABCC11	ATP-binding cassette, sub-family C (CFTR/MRP), member 11	ABC fehérje
ABCD1-Hs00163610_m1	ABCD1	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 1	ABC fehérje
ABCD2-Hs00193054_m1	ABCD2	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 2	ABC fehérje
ABCD3-Hs00161065_m1	ABCD3	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 3	ABC fehérje
ABCD4-Hs00929495_m1	ABCD4	ATP-binding cassette, sub-family D (ALD), member 4	ABC fehérje
ABCG1-Hs00245154_m1	ABCG1	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 1	ABC fehérje
ABCG2-Hs01053790_m1	ABCG2	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 2	ABC fehérje
ABCG4-Hs00967540_m1	ABCG4	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 4	ABC fehérje
ABCG5-Hs00223686_m1	ABCG5	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 5	ABC fehérje
ABCG8-Hs00223690_m1	ABCG8	ATP-binding cassette, sub-family G (WHITE), member 8	ABC fehérje
SLC10A1-Hs00161820_m1	SLC10A1	solute carrier family 10 (sodium/bile acid cotransporter), member 1	SLC fehérje
SLC22A1-Hs00427552_m1	SLC22A1	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 1	SLC fehérje
SLC22A2-Hs01010723_m1	SLC22A2	solute carrier family 22 (organic cation transporter), member 2	SLC fehérje
SLC47A1-Hs00217320_m1	SLC47A1	solute carrier family 47 (multidrug and toxin extrusion), member 1	SLC fehérje
SLCO1A2-Hs00366488_m1	SLCO1A2	solute carrier organic anion transporter family, member 1A2	SLC fehérje
SLCO1B1-Hs00272374_m1	SLCO1B1	solute carrier organic anion transporter family, member 1B1	SLC fehérje
SLCO1B3-Hs00251986_m1	SLCO1B3	solute carrier organic anion transporter family, member 1B3	SLC fehérje

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGVITATÁSUK

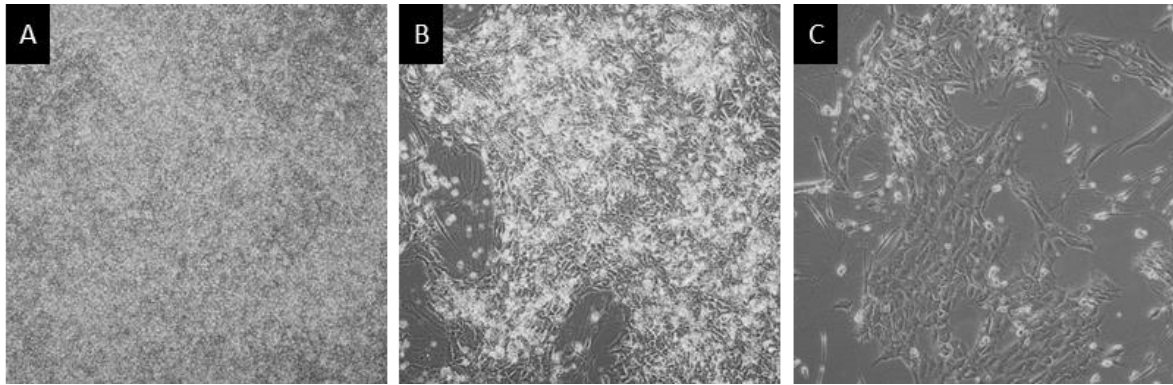
4.1. Hatékony differenciációs protokoll beállítása HUES9 őssejtekre

Munkánk első lépése a megfelelő differenciációs protokoll kiválasztása volt. Korábbi munkánk során használtunk többlépcsős, irányított differenciációs eljárásokat, amivel sikeresen tudtunk májirányú őssejt-differenciációt végezni HUES1 valamint HUES9 sejtvonalakon is (121,130,138). Ezek az eljárások bár jól használhatók voltak, azonban még az első májirányú differenciációs eljárások között szerepelnek, és a hatékonyságuk elmaradt a később leírt eljárásokhoz képest. Ezekből a munkánkból kiderült az is, hogy nem minden embrionális őssejtvonal képes ugyanolyan hatékonysággal májirányba differenciálódni. Esetünkben a HUES9 sejtvonalból hatékonyabban lehetett májsejtszerű sejteket előállítani, mint a HUES1 sejtvonalból (138). Az iPS sejtek megjelenésével valós igény formálódott olyan differenciációs eljárások megalkotására, amelyekkel indukált pluripotens sejteket is hatékonyan lehet májirányba differenciálni. Az első ilyen protokoll 2010-ben jelent meg és egy széles körben, ES és iPS pluripotens sejtvonalon is hatékonyan alkalmazható eljárást mutattak be a szerzők (**9. ábra**) (135).



9. ábra A Si-Tayeb és munkatársai által bemutatott differenciációs eljárás összefoglaló ábrája, az egyes szakaszok időtartamának, valamint az alkalmazott tápfolyadékok összetételének és az oxigénkörnyezet feltüntetésével. A (135) alapján.

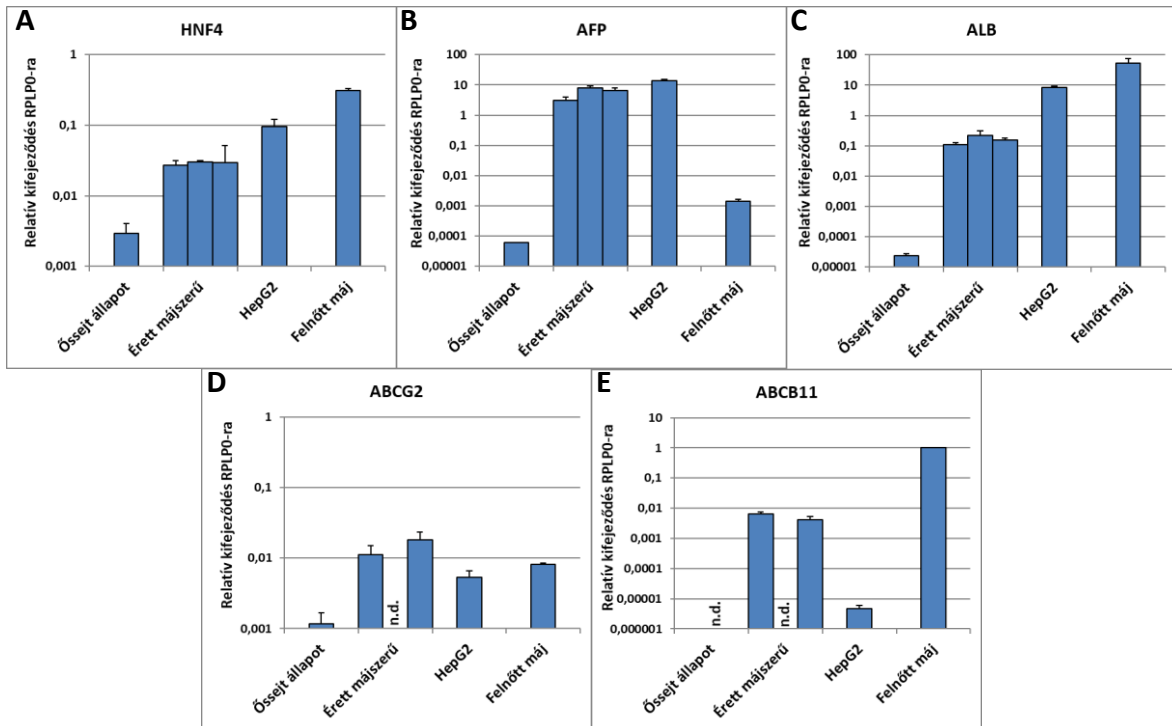
Ennek a protokollnak további előnye volt, hogy igyekeztek a nem jól definiált összetevőket kihagyni az eljárásból (pl. szérumok), így az ezek varianciájából származó bizonytalanságokat el lehetett kerülni és a reprodukálhatóság is javult. Munkánk korai fázisában mi is kipróbáltuk ezt a módszert, azonban vegyes eredményeket kaptunk. Az általunk hatékonyabban differenciálhatónak tartott HUES9 sejtekből kiindulva, a Si-Tayeb és munkatársai által leírt eljárást követve többször el sem jutottak a sejtek a differenciációs folyamat végéig. Májspecifikált állapotban, szinte csak fibroblaszt morfológiával rendelkező sejtek maradtak a kultúrában, amelyek a következő szakaszban (hepatoblaszt formáció) gyakorlatilag kivétel nélkül elpusztultak (**10. ábra**).



10. ábra Morfológiai változások a HUES9 őssejtvonal Si-Tayeb és munkatársai eljárása szerint végzett májirányú differenciációja során. (A) HUES9 őssejtek a differenciálás 72 órával a Matrigelre történő kiültetés után. (B) Endoderma állapot. (C) Májspecifikált állapot.

Kísérleteink alatt megfigyeltük, hogy a HUES9 sejtek a protokollt követve (5-7 nap őssejt állapotban) túlságosan hamar benövik a tenyésztőedény felületét. A differenciáció következő lépésében (endoderma formálás) az Activin A növekedési faktorral történő indukció hatására nagymértékű sejtpusztulás lép fel a tenyészetben, amelynek következményeként az életben maradt sejtekből valószínűleg csak csekély mértékű az endodermális irányultságú sejtek száma, inkább mezenchimális irányú átalakuláson keresztülment sejtek uralják a sejt kultúrát. Ezekből a fibroblasztszerű sejtekből a kapott tápfolyadékok hatására nem keletkeztek májspecifikus sejtek és a továbbiakban újabb sejtpusztulási hullám következett be. Amikor lerövidítettük az őssejt állapotban tartást két napra a differenciáció hatékonyan végbement. Emellett a későbbiekben teljesen elhagytuk a hypoxiás tenyésztési körülményeket és nem tapasztaltunk negatív hatást a differenciáció folyamatára. Egy később megjelent cikkre támaszkodva több olyan módosítást is végrehajtottunk a protokollban, amely tovább finomította és jobban definiálta a differenciációs folyamat lépéseit, tovább javítva a reprodukálhatóságot (124). Ezen változtatások közül a legfontosabbak az alábbiak voltak: a definitív endoderma képzésénél ketté bontottuk ezt a szakaszt, és az első két napban az Activin A mellett BMP4 és FGF2 is került a tápfolyadékba, valamint a teljes szakasz során inzulinmentes B27 szérumbhelyettesítőt használtunk. A differenciáció utolsó szakaszában a HCM tápfolyadékból kihagytuk az EGF komponenst. Ezek mellett az inzulinmentes és az inzulint tartalmazó B27 szérumbhelyettesítő komponenst is teljesen szintetikusra cseréltük, amelyet a (124) közleményben megadott katalógusszámokon szereztünk be a gyártótól. Az fentebb leírtak során alakult ki az a differenciációs protokoll, amelyet a 3.2.1-3.2.3 fejezetekben és a **9. ábrán** részletesen bemutatunk. Az így kialakított eljárással több ízben végeztünk HUES9 sejtekből májirányú differenciációt és a kapott mintákban kvantitatív PCR

módszerrel megvizsgáltuk számos kitüntetett májmarker génkifejeződését (**11. ábra**). Három biológiai párhuzamos eredményeiből kiolvasható, hogy a HNF4, AFP és az ALB

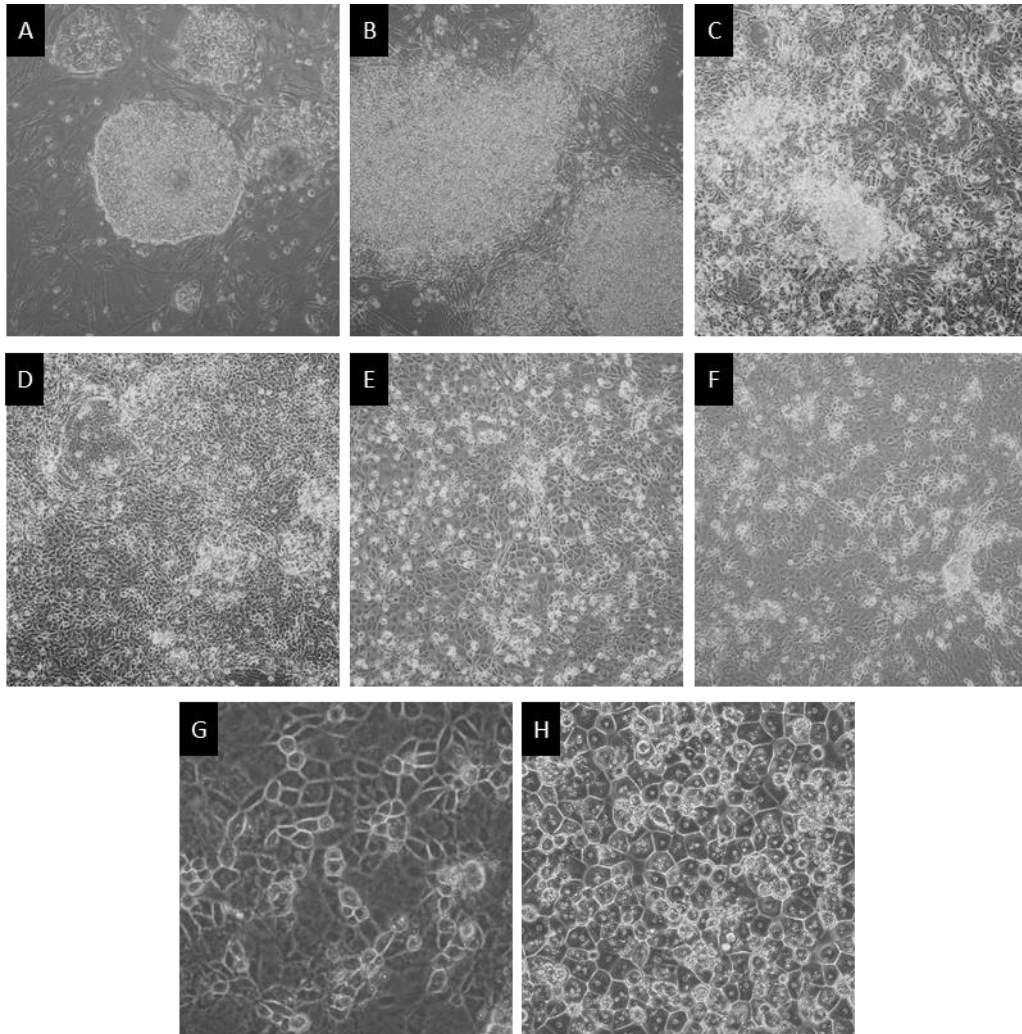


11. ábra Három biológiai párhuzamosból származó érett májszerű sejtek (22 nap) génkifejeződésének összehasonlítása. Három májmarker (A-C) és két ABC transzporter (D-E) kifejeződését vizsgáltuk qPCR technikával. Az össejt állapot a két napig Matrigelen tenyésztett HUES9 sejtekre vonatkozik. Az érett májszerű minták három biológiai párhuzamosból differenciáltatott sejteket jelölnek, valamint összehasonlításként alacsony passzázsszámú HepG2 sejteket és felnőtt májból származó mintákat használtunk. A hibásávok S.D.-t jelölnek három technikai ismétlés alapján (n=3).

szintje is jelentősen megemelkedett a kiindulási össejt állapothoz képest, egymáshoz viszonyítva viszont nem detektáltunk jelentős eltérést (**11. ábra A-C**). Az ABCG2 és ABCB11 esetében a háromból két mintában szintén megemelkedett a vizsgált transzporterek kifejeződését, és egymáshoz viszonyítva szintén nem volt jelentős eltérés a szintjeik között (**11. ábra D-E**). Egy minta esetében azonban nem tudtuk ezen gének kifejeződését detektálni. **Az eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk használt eljárással jól reprodukálhatóan tudtunk májirányú össejt-differenciációt végezni HUES9 sejtekből.**

4.2. Morfológiai és sejtosztódási vizsgálatok HUES9 sejtek májirányú differenciációja során.

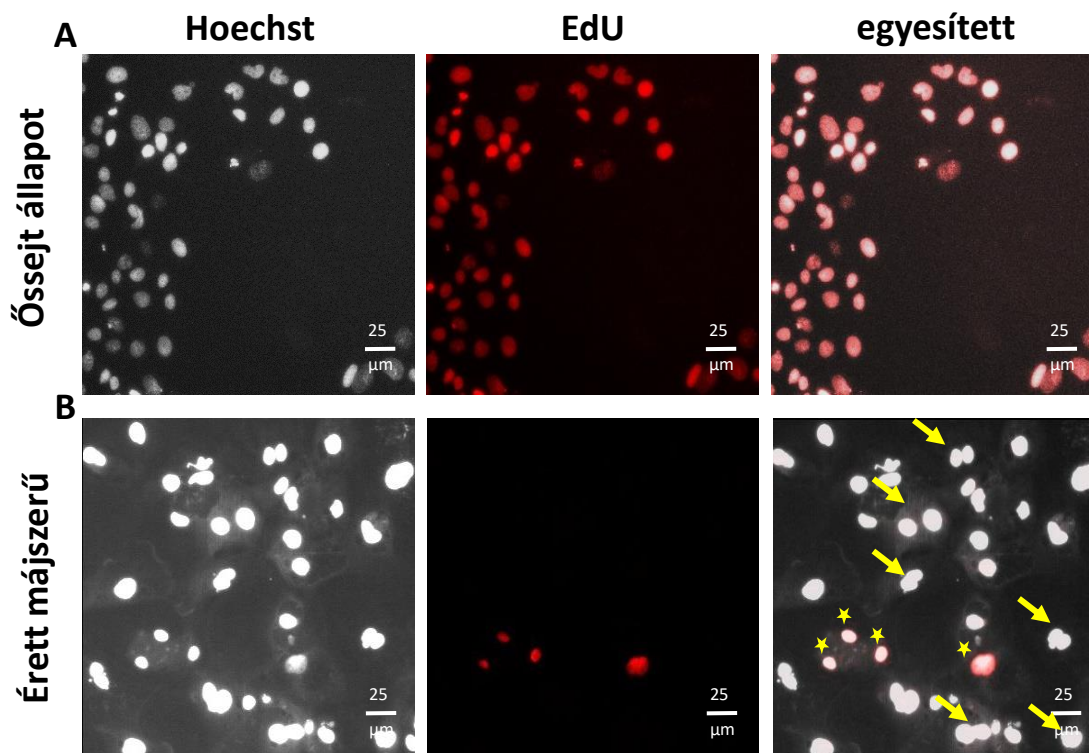
A 12. ábrán egy őssejt-differenciáció során végbemenő tipikus morfológiai változásokat mutatjuk be.



12. ábra Morfológiai változások a HUES9 őssejtvonal májirányú differenciációja során. (A) HUES9 őssejtek a differenciálás 0. napján MEF sejteken. (B) HUES9 őssejtek 24 órával a Matrigelre történő kiültetés után. (C) Endoderma állapot. (D) Májspecifikált állapot. (E) Éretlen májszerű állapot. (F) Érett májszerű állapot. (G) Érett májszerű állapot nagyobb nagyítással. (H) Primer májsejtkultúra (Cryopreserved Human Hepatocytes, Lonza).

A HUES9 sejtek - a humán embrionális őssejtekre jellemző módon - kis csomókban nőnek a MEF dajkasejtrétegen (12. ábra A). A Matrigelre történő kiültetés után 1 nappal általában már elérik a tenyészetek a differenciálhatóság szempontjából optimálisnak tekinthető 90%-os konfluenciát (12. ábra B), majd az endoderma irányba történő indukció során a morfológia jelentősen megváltozik. Ebben a szakaszban az is megfigyelhető, hogy az Activin A indukció következtében fellépő apoptózis miatt az elpusztult sejtek

felhalmozódnak az élő sejtek tetején (fénylő kerek pöttyök – **12. ábra C**). Az Activin A növekedési faktor hatására fellépő sejtpusztulás már korábbról ismert jelenség (144–146). A differenciáció következő szakaszaiban a sejtek egyre inkább a májsejtekre jellemző morfológiai jegyeket mutatnak (**12. ábra D-F**). A sejtek fokozatosan egyre szögletesebbek lesznek, és a nagyobb nagyítású képen a májsejtekre jellemző kétmagvú sejteket is megfigyelhetünk (**12. ábra G**), valamint a sejtek morfológiája a primer humán májsejtekre hasonlít (**12. ábra H**). A két magvú sejtek mellett egy másik májsejtekre jellemző sajátosság, hogy nagyon ritkán osztódnak, az életidejük *in vivo* 5-6 hónap. Hogy ellenőrizzük a differenciáltatott sejtek proliferációját, sejtosztódási vizsgálatot is végeztünk. Az 5-ethynyl-2'-deoxyuridine (EdU), egy timidin-analóg DNS-be történő beépülésén keresztül vizsgáltuk a sejtek osztódását. Az EdU vegyületet a differenciációs folyamat utolsó 24 órájában (a 21. napon) a tenyésztőmédiumban adtuk a sejtekhez, így azok a sejtosztódás során képesek voltak beépíteni az újonnan szintetizálódó DNS-ükbe. Az EdU-hoz kovalensen AlexaFluor festéket lehet kötni egy réz katalizálta alkin-azid reakció keretében, amelynek eredményeként láthatóvá válik az újonnan szintetizálódott DNS. A sejtmagok és az újonnan szintetizálódott DNS együttes vizualizációja esetén lehetőség nyílik az osztódott sejtek számszerűsítésére is (**13. ábra**).



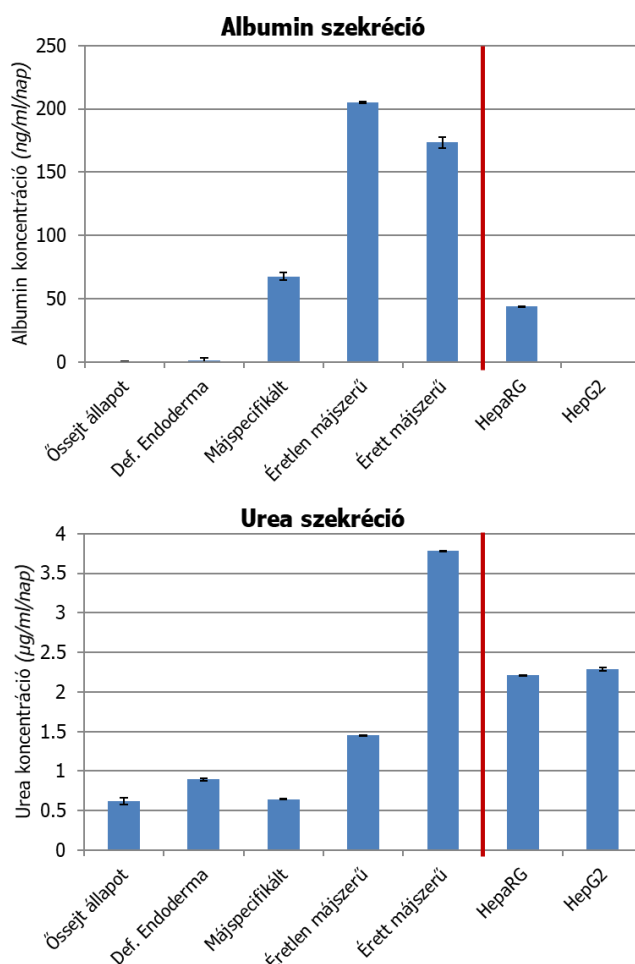
13. ábra Sejtosztódási vizsgálatok HUES9 őssejteken és a belőlük differenciáltatott érett májszerű sejteken. Az A soron a HUES9 sejtek, míg a B soron a differenciáltatott májsejtszerű sejtek láthatóak. Sorrendben a Hoechst festéssel festett sejtmagok, a 24 órán belül osztódott EdU pozitív sejtmagok és az egyesített ábrák láthatóak. A B sor esetében az egyesített ábrán a sárga csillagok a EdU pozitív sejtmagokat, míg a nyilak a kétmagvú sejteket jelölik. A mérce 25 μm -t jelöl (88).

Eredményeink azt mutatják, hogy az őssejtek esetében még 100%-os volt az átfedés a sejtmagfestés és az EdU pozitív sejtmagok között, tehát mindegyik sejt osztódott legalább egyszer 24 óra alatt, addig a keletkezett májsejtszerű sejtek esetében már csak a magok $7.15 \pm 4.5\%$ -a mutatkozott EdU pozitívnak. A májsejtszerű sejtek esetében konkrét sejtosztódási arányt azért nem lehet meghatározni, mert a tenyészetben vegyesen, változó arányban vannak jelen egy és két sejtmaggal rendelkező sejtek (13. ábra B). **A morfológiai és sejtosztódási vizsgálatok eredményei együttesen azt jelzik, hogy a differenciációs folyamat során a sejtek fokozatosan egyre jobban hasonlítanak a primer májsejt tenyészetekhez és differenciált, májsejtekre jellemző állapotban vannak.**

4.3. Funkcionális mérések és májspecifikus markerek kifejeződésének vizsgálata HUES9 őssejték májirányú differenciációja során.

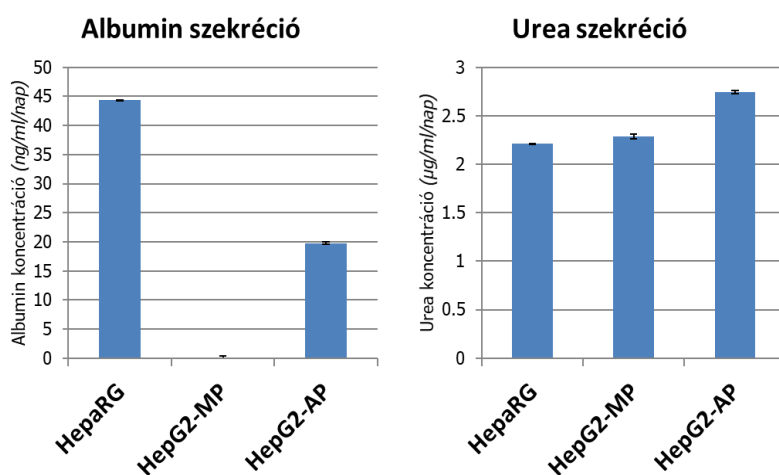
4.3.1. Tenyésztőmediumba kiválasztott humán albumin és urea meghatározása

A morfológiai és sejtosztódási vizsgálatok mellett fontosnak tartottuk a májra jellemző szekrétumok jelenlétének vizsgálatát a tápfolyadékban, amelyből a sejtek funkcionális aktivitására lehet következtetni. Ebből a célból a célból a pluripotens sejtek *in vitro* májirányú differenciációja során a legszélesebb körben elfogadott markerek, az albumin és az urea tápfolyadékba történő szekréciójának a vizsgálatát végeztük el. Kontrollként a korábban a legtöbb tanulmányban alkalmazott májsejt-modell sejtvonalat, a HepG2-t, valamint az utóbbi években egyre szélesebb körben alkalmazott HepaRG sejteket használtunk. A humán albumint legkorábban az endodermális állapotban detektáltuk, azonban a differenciáció előrehaladtával lényegesen magasabb értékeket mértünk (**14. ábra**). A legmagasabb koncentrációkat a differenciáció utolsó két szakaszában detektáltuk,



14. ábra Albumin és urea szekréciója a tápfolyadékba a differenciáció során. Az egyes mintákhoz tartozó koncentrációkat a mintákban mért teljes fehérjetartalomra normalizáltuk. A hibasávok S.E.M.-et jelölnek (n=4) (88).

és ezek az értékek jóval magasabbak voltak, mint amiket a kontroll sejtek esetében találtunk. Az urea koncentrációját már a differenciáció legelejétől tudtuk detektálni, azonban számottevő emelkedést tapasztaltunk az éretlen májszerű stádiumban, majd a differenciáció utolsó stádiumában mértük a legmagasabb koncentrációt (**14. ábra**). Az utóbbi érték, ahogyan az albumin esetében is, meghaladta a kontroll sejtek esetében mért koncentrációkat. Eredményeink alapján elmondható, hogy mind az albumin, mind az urea kiválasztás alapján a differenciálódott sejtek májsejtekre jellemző karakterrel rendelkeznek. **Eredményeink összhangban vannak az irodalomban található megfigyelésekkel, teljesítve a májirányú differenciáció sikerességére vonatkozó széles körben elfogadott kritériumokat.** Érdeemes megjegyezni, hogy a HepG2 sejt vonal esetében nem termelődött detektálható mennyiségű albumin, azonban az urea szekréciójában nem volt számottevő különbség a HepaRG és a HepG2 sejtek között. Ennek egyik lehetséges oka az lehet, hogy a HepG2 sejtek a tenyésztés folyamán elvesztették az albumintermelési képességüket. Ezt vizsgálva megmértünk olyan HepG2 sejtekről származó felülűsöket, amelyeket éppen csak tenyésztésbe vontuk ($p \leq 5$), illetve hosszabb ideje tenyésztett ($p \geq 25$) sejtekről származókat is (**15. ábra**). Az eredmények alapján elmondható, hogy a rövid ideig tenyésztett sejtek még

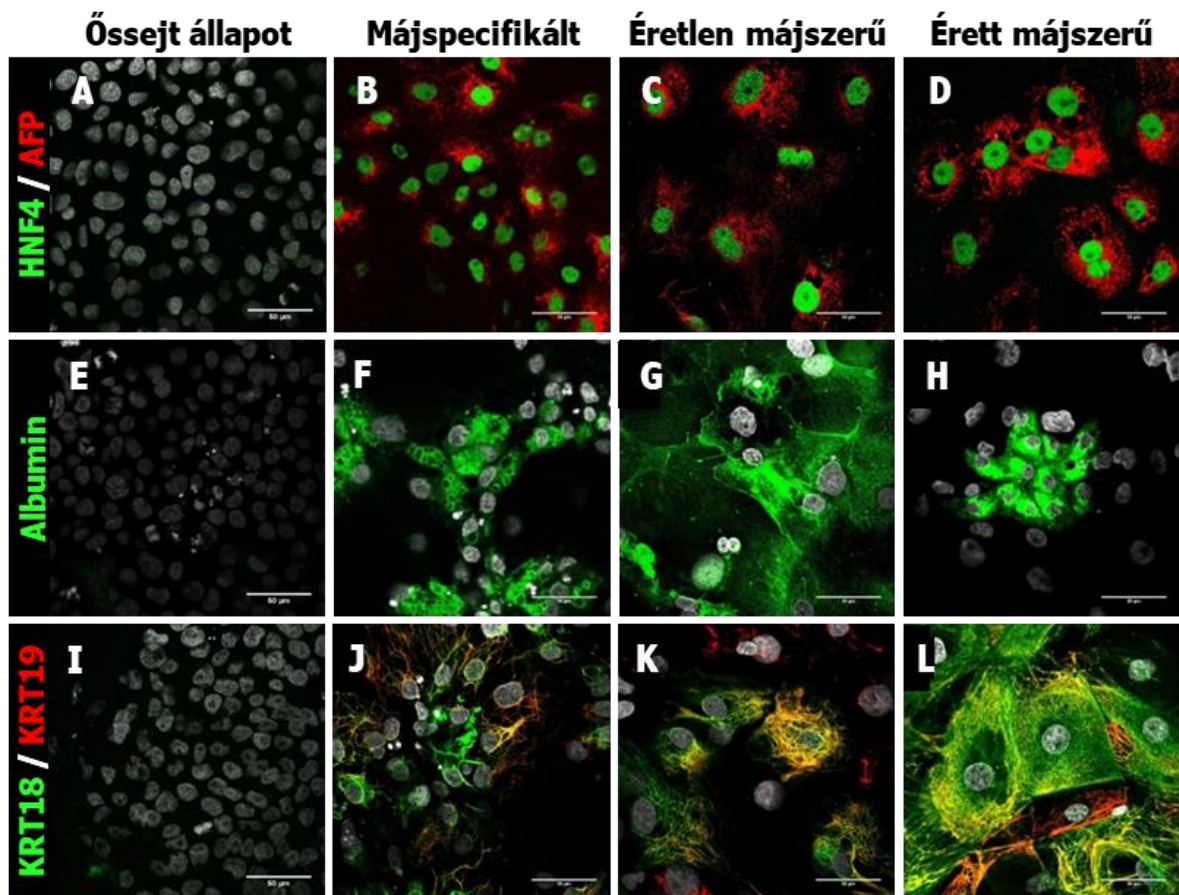


15. ábra Albumin és urea szintek változásai a különböző májmodellsejtek esetében. A felülűsöket 24 órával a médiumcsere után gyűjtöttük HepaRG sejtekről, valamint, magas passzázsú (HepG2-MP; $p \geq 25$), és alacsony passzázsú (HepG2-AP; $p \leq 5$) HepG2 sejtekről. Az egyes mintákhoz tartozó koncentrációkat a mintákban mért teljes fehérjetartalomra normalizáltuk. A hibasávok a S.E.M.-et jelölik ($n=3$) (88).

produkáltak albumint, azonban ez később gyakorlatilag eltűnt. Az urea szekréciójában viszont nem találtunk különbséget a HepG2 sejtek között. **Ebből arra lehet következtetni, hogy a tenyésztés hatására bizonyos tulajdonságokat szelektíven elveszítene a HepG2 sejtek, feltehetően a rákos eredet miatt nem stabil a genetikai állományuk következtében.**

4.3.2. Különböző májspecifikus markerek kifejeződésének vizsgálata immunfluoreszcens jelöléssel.

A felülúszóból történő funkcionális vizsgálatok mellett specifikus májmarkerek fehérje szintű kifejeződését és sejten belüli elhelyezkedését is meg kívántuk vizsgálni. Ehhez immunfluoreszcens jelöléssel kiválasztottunk öt májspecifikus markert. Megvizsgáltuk a HNF4 nukleáris receptorfehérje kifejeződését és azt tapasztaltuk, hogy őssejt állapotban a sejtekben nem fejeződik ki a HNF4, azonban a májspecifikált állapottól kezdve ki tudtuk mutatni a fehérje jelenlétét és egészen a differenciáció végéig tudtuk detektálni a mintáinkban (**16. ábra A-D**). A HNF4 sejten belüli elhelyezkedéséről megállapítható volt, hogy a vártan megfelelően a magban lokalizálódott. A HNF4 fehérjével együtt az alfa főtális fehérje (AFP) kifejeződését is vizsgáltuk (**16. ábra A-D**). A termelődése a HNF4-hez hasonló módon már a májfejlődés korai szakaszában megfigyelhető, emiatt elsősorban embrionális májmarkerként tekinthetünk az AFP-re, amely a HNF4 kifejeződéséhez

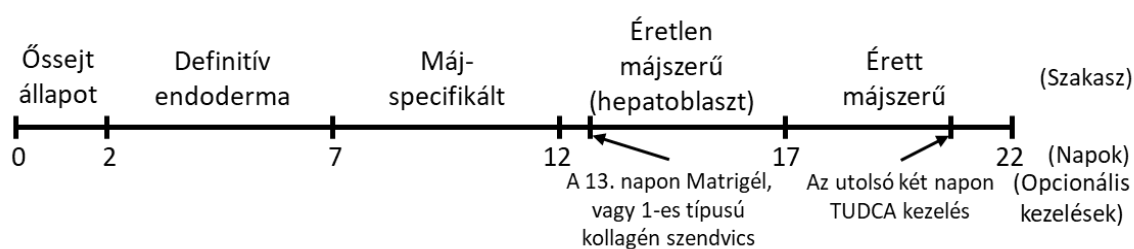


16. ábra Májspecifikus markerek kifejeződésének vizsgálata a differenciáció során immunfluoreszcens jelöléssel és konfokális mikroszkópiával. Az differenciáció szakaszai a képoszlopok fölött találhatóak, míg a vizsgált markerek soronként változnak. Az első sorban (A-D panel) a HNF4 α (zöld) és az AFP (piros), a második sorban (E-H) az albumin (zöld), míg a harmadik sorban (I-L) a KRT18 (zöld) és a KRT19 (piros) lokalizációját láthatjuk. A sejtmagokat minden esetben szürke színnel jelöltük. A mércse 50 μ m-t jelöl (88).

hasonlóan összejt állapotban nem fejeződik ki a mintáinkban (16. ábra A-D). A differenciáció későbbi szakaszaiban folyamatosan tudtuk detektálni a fehérje jelenlétét a sejtplazmában. A HNF4 és az AFP jelenléte a mintáinkban a sejtek májirányú elköteleződését jelzi. Az albumin fehérje termelődését a szekréción mérés mellett az immunfluoreszcens vizsgálatok is megerősítették (16. ábra E-H). A fehérje elhelyezkedéséről megállapítható, hogy a citoplazmában található és a differenciáció végén szekréción vezikuláknak tűnő képletekben nagy mennyiségben halmozódik fel, amely összhangban van a szekréción mérés eredményeivel. Megvizsgáltuk két vázfehérje, a májsejtekre jellemző KRT18 és az epevezetéksejtekre jellemző KRT19 kifejeződését (16. ábra I-L). A korábban vizsgált markerekkel megegyezően az összejt állapotban itt sem detektáltuk ezen fehérjék kifejeződését. A későbbi differenciációs szakaszokban azonban fokozatosan egyre kifejezettebb lett mindkét fehérje jelenléte. Elhelyezkedésüket a vártak megfelelően hálózatos formában észleltük. **Fontos megjegyezni, hogy a differenciáció utolsó, érett májszerű szakaszában a sejtek jelentős részére jellemző volt, hogy dupla pozitívítást mutattak. Ez az eredmény, valamint az, hogy az embrionális májsejtekre jellemző AFP kifejeződése nem csökkent ebben a stádiumban azt jelentheti, hogy a májirányú differenciációja nem teljesen fejeződik be, és egyfajta éretlen állapotban vannak a sejtek. A májsejtekre és az epevezetéksejtekre jellemző keratinok együttes kifejezése miatt elképzelhető, hogy bipotens progenitor stádiumban lehetnek a sejtek, amelyekből máj- és epevezetéksejtek még egyaránt keletkezhetnek.**

4.4. A differenciáció során keletkező májsejtek érésének elősegítése a tenyésztési körülmények megváltoztatásával

A munkánk egyik célja volt, hogy a differenciáció során keletkező sejtek érését a lehető legjobban elősegítsük, ugyanis többek között a farmakológiai vizsgálatok során ez kiemelt jelentőséggel bír. E célból két újabb módosítást alkalmaztunk a differenciációs protokollunkban, amelyek közül az egyik az úgynevezett szendvics tenyészetek (SW) készítése, a másik pedig a TUDCA kezelés volt (17. ábra).



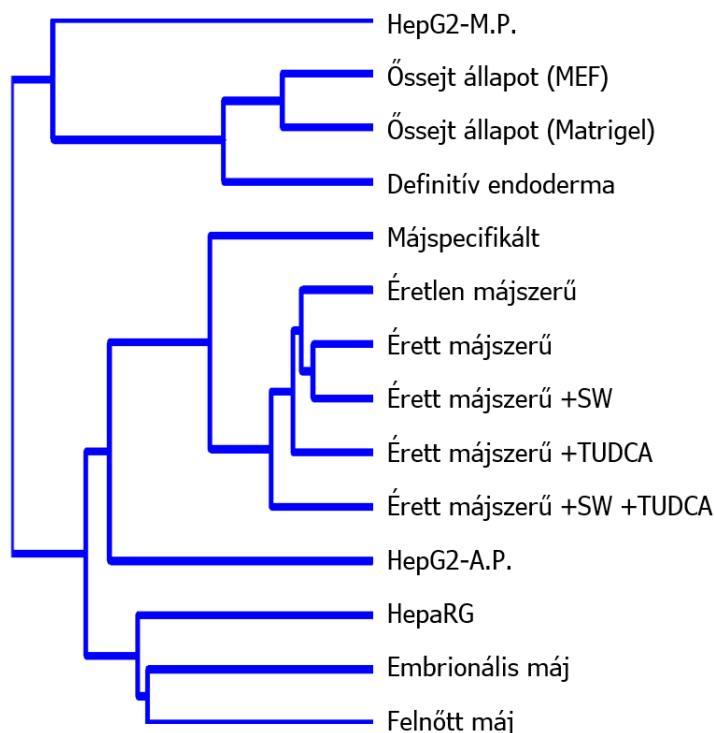
17. ábra A differenciációs folyamat és a kiegészítő kezelések bemutató sematikus ábra. A különböző szendvics tenyészetek kialakítása 13. napon történt, míg a TUDCA kezelés a 20. napon kezdődött (88).

Korábban több kutatócsoporttal együtt kimutattuk, hogy a háromdimenziós körülményeknek az úgynevezett szendvics tenyészeteknek pozitív hatása lehet a májirányú differenciációra (107–111,147). Azt is igazolták, hogy a szendvics tenyészetek pozitív hatásúak a sejtpolarizációra, és egyes fehérjék lokalizációját is megváltoztathatják patkány és humán primer májsejtek esetében (148,149). Az epesókkal kapcsolatban korábbi kutatások kimutatták, hogy megemelhetik egyes májspecifikus membrántranszporterek szintjét, valamint elősegíthetik azok megfelelő lokalizációját (113–115). Kísérleteinkben korábbi eredményeink alapján 10 napos szendvics tenyészetben (SW) történő differenciáltatást, valamint az utolsó két napban TUDCA kezelést alkalmaztunk (115,147). Utóbbit különböző kolesztatikus májmegbetegedések során kezelésként is szoktak alkalmazni. A továbbiakban a különböző differenciációs protokollokkal létrehozott májsejtek összehasonlító elemzését mutatom be.

4.5. A HUES9 őssejtek és a májirányú differenciáció során keletkező sejtek génkifejeződésének részletes vizsgálata TLDA-val, és összehasonlítása különböző kontroll mintákkal

A munkánk során a lehető legrészletesebb képet szeretnénk volna kapni a differenciáció során a lezajló májspecifikus génkifejeződési változásokról, viszont ehhez a vizsgálataink kezdetekor nem állt rendelkezésünkre olyan eszköz, amellyel nagy áteresztőképességgel, specifikusan a májirányú őssejt-differenciációt lehetett volna vizsgálni. Ebből a célból terveztünk egy olyan 384 lyukú TaqMan Low-Density array-t (TLDA), amellyel qPCR reakcióban egyszerre több mintából nagy érzékenységgel és pontossággal meg tudtuk határozni a kiválasztott gének kifejeződését. A TLDA kártyán szereplő próbák egy részét olyan génekhez válogattuk ki, amelyeket az irodalomban korábban már referenciaként használtak májirányú őssejt-differenciáció során. A próbák másik részét specifikusan az irodalomban eddig nem, vagy csak felületesen vizsgált ABC-transzporterekre és más fontos májtranszporterekre tervezve választottuk ki. A kártyánkon a génkifejezések normalizálásának céljából 8 háztartási gén szerepelt, emellett 36 különböző csírvonal és májmarker (3 őssejt, 1-1 ekto- és endoderma, 2 mezoderma, 6 korai máj, 3 epevezetéksejt, 20 májsejt), valamint 47 membrán transzporter, köztük 40 ABC fehérjét kódoló génre specifikus próba kapott helyet (3.6.; **3. táblázat**). A mesterséges termékek, valamint a biológiai különbségek okozta eltérések kiszűrése miatt a TLDA futások során a két technikai párhuzamos mellett két biológiai párhuzamossal dolgoztunk és a kapott eredmények átlagát vettük az analízisünk alapjául. A vizsgált mintáink kiválasztásánál szempontunk volt, hogy a lehető legszélesebb spektrumot tudjuk megvizsgálni az őssejt állapotól kezdve az érett májsejtekig. A HUES9 sejtekből két eltérő tenyésztési formát is megvizsgáltunk, a májirányú őssejt-differenciáció kiindulási pontját adó Matrigel rétegen lévő, valamint az aranystenderdek tekintett MEF sejtrétegen növekvő sejtek génkifejeződését is megvizsgáltuk. A májmodell sejtvonal kontrollok csoportjában a terminálisan differenciált HepaRG sejtek mellett két HepG2 mintát is vizsgáltunk. Ahogyan azt korábban bemutattuk (**15. ábra**) a HepG2 sejtvonal hosszútávon nem feltétlenül bír stabil genetikai állománnyal, ezért alacsony (AP; $p < 5$), és magas (MP; $p > 25$) passzázsszámú tenyészetből származó mintát is megvizsgáltunk. A májmodell sejtvonalak mellett humán embrionális, valamint felnőtt májából gyűjtött RNS mintákat is használtunk.

Normalizált (dCt) génkifejeződési értékek alapján hierarchikus klaszteranalízist végeztünk. Ennek alapján két nagyobb csoport különíthető el a mintáink között (**18. ábra**).

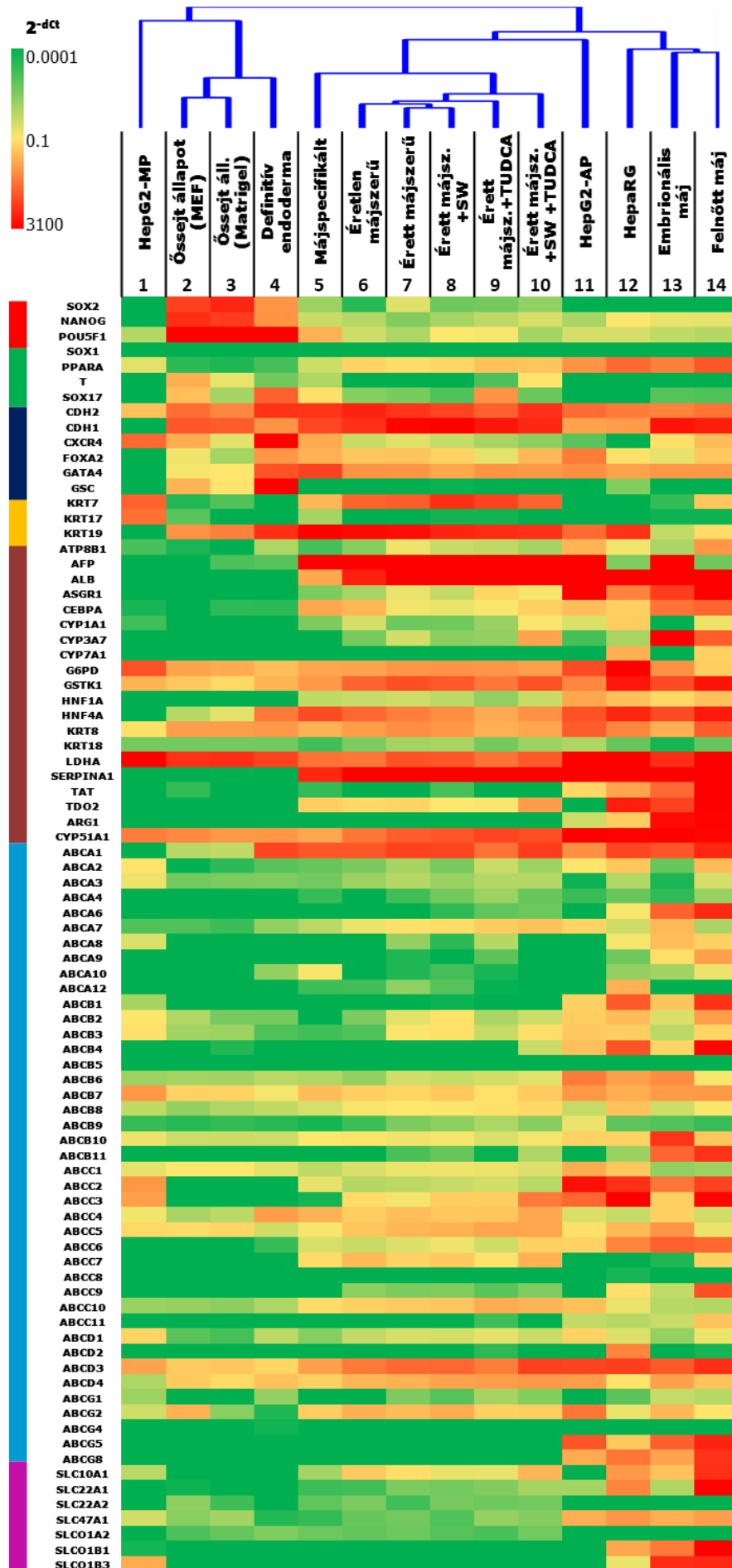


18. ábra A különböző minták csoportosulása hierarchikus klaszteranalízis után. A TLDA mérések adataiból számított dCt értékek alapján UPGMA algoritmussal készítettük a dendrogramot. Rövidítések az ábrán: MEF = egér embrionális fibroblaszt; SW = szendvics tenyésztet; TUDCA; taurourszodeoxikolsav; A.P. = alacsony passzázsszámú; M.P. = magas passzázsszámú (88)

Az első ilyen csoportba tartoznak az össejt állapotot reprezentáló minták, valamint a belőlük származó definitív endoderma. Meglepő módon ehhez a csoporthoz sorolódik a magas passzázsszámmal rendelkező HepG2 minta. A második nagy csoport felosztható két kisebb klaszterre. Az egyikbe a májspecifikált állapottól kezdődően a differenciáció többi mintája tartozik, a másikba pedig a HepaRG sejtek, valamint az embrionális és a felnőtt máj tartozik. A két kisebb klaszter közé beékelődve található az alacsony passzázsszámú HepG2 minta. A klaszteranalízis eredményeként kirajzolódó ágak és csoportok alapján megállapítható, hogy az össejt-differenciáció során a keletkező sejtek egyre közelebb kerülnek a felnőtt májsejtek génkifejeződési profiljához. A különböző passzázsszámú HepG2 sejtek drasztikus elkülönülése arra utal, hogy a sejtek a tenyésztésben eltöltött idő alatt nagy mértékben szenvednek el olyan változásokat, amelyek drasztikusan változtatják meg a génkifejeződési mintázatukat, így az egyre kevésbé hasonlít a májsejtekére.

A globális áttekintés mellett elkészítettük az adott mintákra jellemző expressziós profilokat, amelyeket egy hő térképben összegeztünk a 2^{-dCt} értékeket színekkel kódolva (**19. ábra**). A hő térkép segítségével részletesebben lehet tanulmányozni a differenciáció során

végbemenő génkifejeződési változásokat, valamint a fel lehet tární a főbb különbségeket a kontroll mintákhoz képest (**19. ábra**). A normalizált (dCt) értékeken túl a génkifejezések relatív szintváltozásait is kiszámítottuk ddCt módszerrel. Ahol lehetett az érett májszerű állapotot vettük viszonyítási alapként, ahol pedig ezt nem tudtuk megtenni, ott az adott génhez tartozó legrelevánsabb mintát használtuk referenciaként. A kapott eredményeket a **4. táblázat**ban foglaltuk össze, ahol a 2^{-ddCt} értékek vannak feltüntetve.

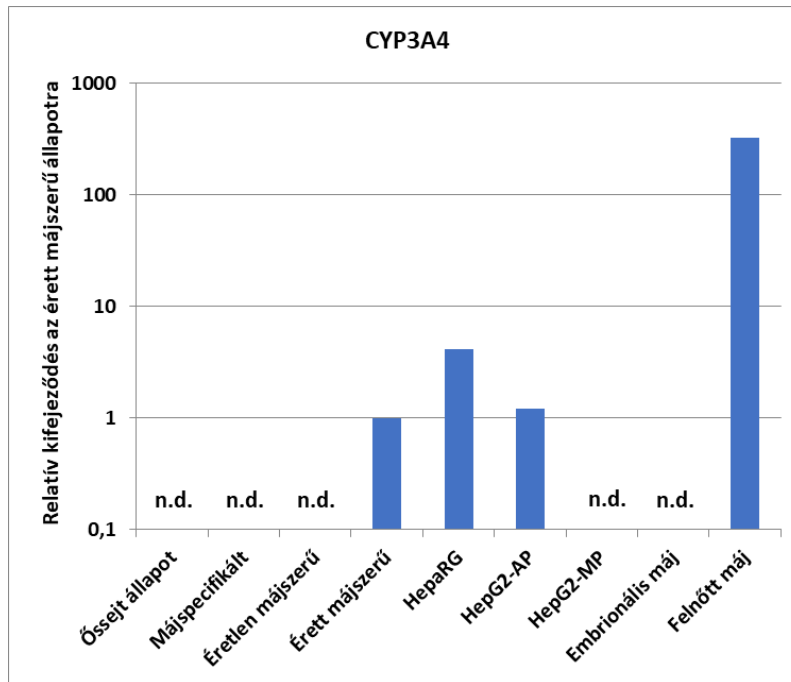


19. ábra Az mRNS alapú génkifejeződések hőterképes összehasonlítása különböző differenciációs szakaszokból származó minták, valamint kontroll minták között. A vizsgált gének az y tengelyen, míg a különböző minták az x tengely mentén vannak feltüntetve. A hőterkép színskódjai az öt legstabilabban kifejeződő referencia gén átlagára történő relatív kifejeződési szinteket jelöli (2-dCt), a piros-magastól, a sárga-közepesen át a zöld-alacsonyig. A vizsgált gének melletti színskódok a különböző csoportba tartozó géneket jelöli: piros – pluripotencia, zöld – csírvonal, sötétkék – korai máj, sárga – epevezetéksejt, barna – májsejt; kék – ABC fehérje, magenta – SLC fehérje (88).

4. táblázat A relatív génkifejeződési szintváltozások (fold change, 2^{-ddct}) táblázatos összefoglalása. A sárga kiemelések azokat a mintákat jelölik, amelyre a relatív értékeket számítottuk. Pirossal a jelentősebb génkifejeződési emelkedéseket jelöltük SW, vagy TUDCA kezelés hatására. N.D.= nem mérhető (88).

		HepG2-HP	Össejt átlapot (MEF)	Össejt 4h (Matrigel)	Definitív endoderma	Májepicelműt	Éretlen májsejt	Érett májsejt	Érett májsejt +SW	Érett májsejt +TUDCA	Érett májsejt +SW +TUDCA	HepG2-AP	HepRG	Embrioidális máj	Felnőtt máj
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
össejt	SOX2	N.D.	20.7	31.9	5.4	0.4	0.1	1	0.2	0.2	0.4	0	0	N.D.	N.D.
össejt	NANOG	0.1	92.3	73.3	18.7	2.5	1.9	1	1.6	2.1	3	1.7	4.7	3.7	3.6
össejt	POU5F1	1.1	552.5	337.7	114.8	6.6	1.5	1	2.8	2.6	0.9	1.7	1.7	1.3	1.1
ektoderma	SOX1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
mezoderma	PPARA	0.6	0.1	0	0.1	0.4	1.2	1	1.1	1.5	1.5	3.2	6.3	4.3	8.5
mezoderma	T	N.D.	1	0.3	0.1	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	0	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
endoderma	SOX17	0.2	10.2	1.7	45.9	6.1	1.2	1	0.6	20.9	0.8	N.D.	N.D.	0.6	0.6
májprogenitor	CDH2	0.1	0.4	0.3	1	1	1.4	1	0.8	0.5	1	0.4	0.3	0.3	0.4
korai máj	CDH1	0	0.3	0.3	0.1	0.3	0.5	1	1.1	0.8	0.6	0.1	0.1	0.8	0.7
korai máj	CXCR4	10.9	3.7	1	99.8	3.7	0.7	1	0.7	0.5	0.4	0.2	N.D.	1.6	2.9
korai máj	FOXA2	N.D.	0.5	0.2	2.1	1.4	1	1	0.8	0.4	1.2	3.2	0.7	0.4	0.9
korai máj	GATA4	N.D.	0.2	0.3	2.9	3.7	1	1	0.7	1	0.9	1.1	0.8	1	1
korai máj	GSC	N.D.	1	0.5	44	N.D.	N.D.	N.D.	0	N.D.	N.D.	N.D.	0.1	N.D.	N.D.
epevezetéksejt	KRT7	0.9	0	0	0	0.2	0.9	1	2.1	1.5	0.9	N.D.	N.D.	0	0.2
epevezetéksejt	KRT17	105.5	2	N.D.	N.D.	5	N.D.	N.D.	1	1	N.D.	N.D.	0.5	1	0.5
epevezetéksejt	KRT19	0	0.1	0.2	0.6	4	1.1	1	0.7	0.6	0.6	0.2	0.6	0	0
májsejt	ATP8B1	0.1	0.1	0	0.4	0.1	0.3	1	0.6	0.5	0.4	2.7	1	0.4	4.4
májsejt	APP	N.D.	N.D.	0	0	0.3	1	1	0.8	0.9	1.6	1.5	0	1.2	0
májsejt	ALB	0	N.D.	N.D.	N.D.	0	0.1	1	0.8	0.5	1.2	11.9	45.3	159.2	88.9
májsejt	ASGR1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	0.4	1	0.6	1.8	1.2	72.1	6.5	19.9	63.2
májsejt	CEBPA	0.1	0	0.1	0.1	3.2	2.5	1	0.9	1.1	1.7	2.3	1.7	7.3	9.3
májsejt	CYP1A1	0.6	N.D.	N.D.	N.D.	1.2	3.8	1	1	1.8	6.1	4.1	10	0.2	5.1
májsejt	CYP3A7	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	1	0.4	0.4	5.1	0.2	0.6	220.5	15.4
májsejt	CYP7A1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.7	N.D.	1
májsejt	G6PD	3	0.8	0.7	0.5	0.8	0.8	1	1	1	0.9	3.3	24.6	1.1	0.4
májsejt	G6TK1	0.2	0.1	0.1	0.2	0.3	0.7	1	0.9	0.5	1	0.4	2.4	1.1	2.5
májsejt	HNF1A	N.D.	N.D.	N.D.	0	0.9	0.9	1	0.8	0.5	0.9	5.2	3.5	2.4	3.4
májsejt	HNF4A	0	0.1	0.1	1.1	2.3	1.4	1	0.8	0.5	0.7	2.1	4.1	2.2	5
májsejt	KRT8	0.3	0.8	0.8	0.8	0.5	0.8	1	0.9	0.6	0.7	2.2	1.1	0.6	2.2
májsejt	KRT18	0.6	0.5	0.6	0.5	0.3	0.6	1	1.1	0.6	0.9	1.2	0.5	0.2	0.5
májsejt	LDHA	7.1	1.7	1.7	1.3	0.6	0.5	1	0.9	0.6	0.9	27.2	4.2	1.8	7.9
májsejt	SERPINA1	N.D.	0	0	N.D.	0.1	0.6	1	0.5	0.5	1.3	4.4	10.6	12.1	26.1
májsejt	TAT	N.D.	0	N.D.	N.D.	0	N.D.	N.D.	0	N.D.	N.D.	0.2	0.4	1	64.4
májsejt	TD02	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.1	0.9	1	0.7	0.7	2.4	N.D.	17.8	10.1	84.5
májsejt (urea)	ARG1	N.D.	0	N.D.	0	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	1	1.1
májsejt (urea)	CYP51A1	0.6	0.5	0.4	0.4	0.3	0.7	1	1.1	1.5	1.3	5.4	4.3	4.5	4
ABC fehérje	ABCA1	0	0	0	0.9	0.7	0.7	1	0.9	0.5	1.1	0.3	0.9	0.7	1.5
ABC fehérje	ABCA2	3.3	0.1	0.2	0.4	0.4	0.6	1	0.6	1.6	0.9	3.2	5.2	0.5	6.1
ABC fehérje	ABCA3	2.1	0.4	0.5	0.5	0.4	0.7	1	0.7	1	1	0.1	1	0.1	1.5
ABC fehérje	ABCA4	N.D.	0.1	N.D.	N.D.	0.9	N.D.	1	2	3.2	1.7	0.9	1.7	0.8	3
ABC fehérje	ABCA6	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	0	0	N.D.	0.1	1	2.5
ABC fehérje	ABCA7	0.1	0.1	0.1	0.2	0.4	0.7	1	1.1	1.4	1.7	1.2	0.5	1.9	0.3
ABC fehérje	ABCA8	2.5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	0.3	1.6	N.D.	N.D.	3.5	7.7	5.7
ABC fehérje	ABCA9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	N.D.	2.1	N.D.	N.D.	2.8	19.9	54
ABC fehérje	ABCA10	N.D.	N.D.	N.D.	4.5	16	N.D.	1	1.6	0.9	N.D.	N.D.	4.5	5.5	13.9
ABC fehérje	ABCA12	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	0.4	1	0.5	0.2	N.D.	N.D.	9.7	N.D.	N.D.
ABC fehérje	ABCB1	0.2	0	0	N.D.	0	N.D.	N.D.	0	N.D.	N.D.	0.8	5.5	1	10.2
ABC fehérje	ABCB2	1.4	0.5	0.3	0.2	0	0.3	1	1.6	0.5	0.8	2.2	2.8	0.9	4.6
ABC fehérje	ABCB3	1.2	0.3	0.3	0.1	0.1	0.1	1	1.2	0.5	1.2	1.7	1.6	0.4	1.4
ABC fehérje	ABCB4	N.D.	N.D.	0	N.D.	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.4	1.4	7.9	1	26.8
ABC fehérje	ABCB5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
ABC fehérje	ABCB6	0.5	0.6	0.5	0.7	0.7	0.4	1	0.9	1	1.2	9.7	5.4	7.4	1.6
ABC fehérje	ABCB7	2.6	1	1	0.7	1.5	1.1	1	1.2	0.8	1.2	2.6	1.8	2.5	2.6
ABC fehérje	ABCB8	0.4	0.3	0.4	0.5	0.6	0.9	1	1	1.1	1.3	0.5	1.8	0.5	0.9
ABC fehérje	ABCB9	0.4	0.3	0.4	0.3	0.3	0.5	1	1.3	1.9	1.2	4.2	0.7	0.6	0.4
ABC fehérje	ABCB10	1	0.6	0.6	0.6	1.2	1.3	1	1.1	0.8	1.1	1.7	1.7	20.7	2
ABC fehérje	ABCB11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1	1.4	0.4	3.6	N.D.	2.8	79.2	179.1
ABC fehérje	ABCC1	0.9	1.3	1.2	0.9	0.5	0.8	1	1	1	0.8	3.2	2	0.3	0.4
ABC fehérje	ABCC2	8.3	N.D.	0	N.D.	1.7	0.9	1	1.2	1.3	1	71.9	43	13.9	32
ABC fehérje	ABCC3	3.5	N.D.	N.D.	N.D.	0.1	1.4	1	1.7	1.7	6.5	8.9	61.6	1.7	41.7
ABC fehérje	ABCC4	0.4	0.2	0.2	1.7	1.2	0.8	1	0.9	0.9	1.4	0.3	0.2	0.7	0.3
ABC fehérje	ABCC5	0.6	0.5	0.6	0.2	0.4	0.8	1	1.1	1.3	1.3	0.5	1	1.7	0.4
ABC fehérje	ABCC6	0	N.D.	0	0.1	0.9	0.8	1	1.2	0.8	2.2	2.2	7.5	13.2	11.5
ABC fehérje	ABCC7	N.D.	N.D.	0	N.D.	0.9	1.5	1	1.2	0.8	1.7	N.D.	N.D.	0	1
ABC fehérje	ABCC8	N.D.	1	1.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	4.1	N.D.	N.D.
ABC fehérje	ABCC9	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.3	1	1.1	0.6	1	N.D.	6	2.5	60
ABC fehérje	ABCC10	0.2	0.2	0.1	0.2	0.8	0.9	1	1.1	1.6	1.4	1.2	0.5	0.3	0.2
ABC fehérje	ABCC11	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.2	N.D.	0.9	0.8	1	3.6
ABC fehérje	ABCD1	2.3	0.2	0.2	0.7	0.4	0.8	1	1	1.2	0.8	2.3	1.1	0.4	1.3
ABC fehérje	ABCD2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.3	N.D.	N.D.	96.1	N.D.	1
ABC fehérje	ABCD3	0.4	0.2	0.2	0.2	0.4	0.8	1	1	0.7	1.9	1.8	1.9	1.3	2.5
ABC fehérje	ABCD4	0.1	0.7	0.5	0.8	0.6	0.9	1	1.2	1.4	1.4	1.4	0.5	1.3	0.7
ABC fehérje	ABCE1	1.5	N.D.	N.D.	1.3	0.1	N.D.	1	0.6	1.7	1.1	0.1	0.7	2.5	2.1
ABC fehérje	ABCE2	0.3	1.2	0.1	0	0.8	1.2	1	1.3	0.7	0.8	3.1	0.4	1.1	0.5
ABC fehérje	ABCE4	1.7	0.6	1.6	2.2	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	1.2	N.D.	1
ABC fehérje	ABCE5	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	N.D.	N.D.	1.2	0.2	1	2.6
ABC fehérje	ABCE8	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	N.D.	0.9	2.1	1	5.9	
SLC fehérje	SLC10A1	0.4	N.D.	N.D.	N.D.	0.3	1.4	1	0.7	0.7	2	N.D.	3.1	1.6	16.3
SLC fehérje	SLC22A1	N.D.	0.2	0.1	0.1	0.4	0.5	1	0.9	1.1	1.7	1.7	25.2	1.9	202.1
SLC fehérje	SLC22A2	N.D.	2.7	1	N.D.	1.5	2.1	1	2.1	1.8	1.9	N.D.	N.D.	0.4	N.D.
SLC fehérje	SLC47A1	3.4	1.3	1.9	0.4	0.4	0.9	1	0.6	1.6	1.3	14.8	22.1	14.7	19.4
SLC fehérje	SLCO1A2	N.D.	0.7	0.9	1.3	1	0.9	1	0.7	0.6	1.1	N.D.	N.D.	N.D.	0.2
SLC fehérje	SLCO1B1	0	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0.5	1	7.8
SLC fehérje	SLCO1B3	0.1	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.	0	1	1.1

Eredményeink alapján elmondható, hogy a pluripotenciához tartozó vizsgált gének szintje (SOX2, NANOG, POU5F1) a differenciáció során gyorsan lecsökkent (**19. ábra és 4. táblázat, 2-7 oszlop**), emellett a kontroll mintákban (**19. ábra és 4. táblázat, 1, 11-14 oszlop**) ezek szintje alacsony volt. A vizsgált SOX1 ektodermális marker kifejeződését nem tudtuk detektálni a mintáinkban, ami arra enged következtetni, hogy ektodermális sejtek nem, vagy csak elhanyagolható mértékben lehettek jelen a kultúrában. A T (Brachyury) mezodermális marker esetében meg kell említeni, hogy a differenciált mintákban alig tudunk expressziót detektálni, csakúgy, mint a kontroll mintákban. A szintén mezodermális marker PPARA gén kifejeződését viszont végig tudtuk detektálni a differenciáció során, valamint a kontroll mintákban is. A májirányú differenciációs markerek, köztük az AFP, ALB, ASGR1, HNF1A, HNF4A, SEPRINA1 (AAT) kifejeződése megindult, majd megemelkedett a differenciáció során. Az AFP és ALB gének detektálhatóságának időpontjai egybevágnak a korábbi megfigyeléseinkkel (4.3.2. fejezet) Mindezek a differenciálódott sejtek májirányú elköteleződését jelentik. Az endodermális, valamint a korai májdifferenciációs markerek szintjei, például a SOX17, CXCR4, GATA4, GSC a vártak megfelelően egy átmeneti expressziós emelkedést követően csökkenni kezdtek. A májsejtekre jellemző keratinok közül a KRT8 és KRT18 jelenlétét végig tudtuk detektálni, melyek közül a KRT18 kifejeződése az érett májszerű állapotban volt a legmagasabb. Érdekesképpen az epevezetéksejtekre jellemző keratinok közül a KRT7 és KRT19 génkifejeződési szintje szintén megemelkedett, ugyanakkor a KRT17 alig volt detektálható a differenciáció során. A KRT19 kifejeződését korábban igazoltuk fehérje szinten is (4.3.2. fejezet). A májsejtekre és az epevezetéksejtekre jellemző keratinok jelenléte a mintában megerősíti azt a feltételezést, hogy a keletkezett sejt kultúrákban a májra jellemző többféle sejt típus is jelen lehet. A májsejtekre jellemző monooxigenázok közül a CYP1A1 és CYP3A7 kifejeződése a differenciáció késői stádiumaiban indukálódott, ugyanakkor a CYP7A1 kifejeződését nem tudtuk detektálni, csak a HepaRG és a felnőtt májmintában. Meg kell említeni, hogy a CYP1A1 kifejeződése a felnőtt májban is alacsony (150,151), illetve hogy a CYP3A7 elsősorban az embrionális májsejtekben termelődik (152,153) A felnőtt májsejtekre jellemző CYP3A4 kifejeződését külön kísérletben vizsgáltuk (**20. ábra**).

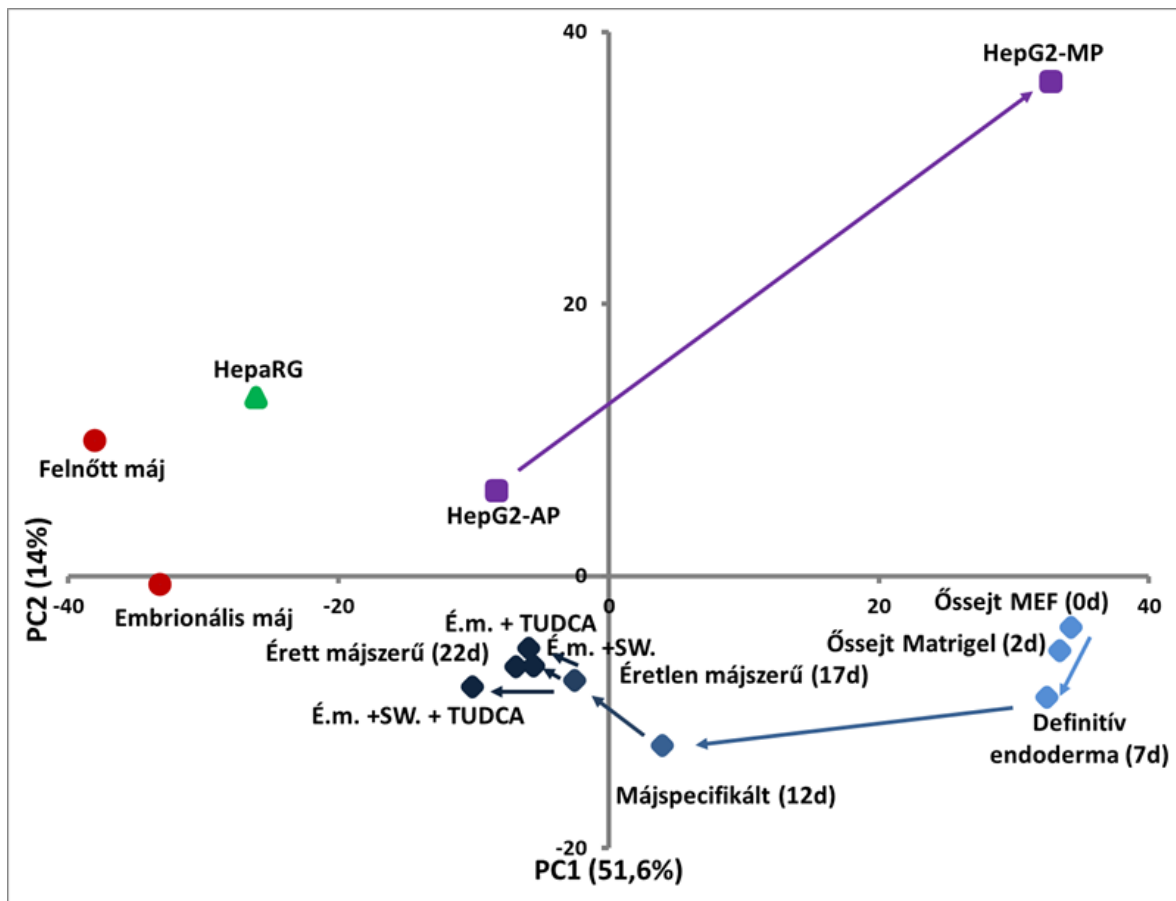


20. ábra A CYP3A4 gén kifejeződésének változása a HUES9 sejtek májirányú differenciációja során. Az mRNA szinteket meghatároztuk a differenciáció különböző szakaszaiban, valamint összehasonlításként a HepaRG, HepG2-AP, HepG2-MP sejtekben, embrionális és felnőtt májmintákban is. Az érett májszerű mintákat használtuk referenciapontként, akárcsak a 3. táblázatban. Az n.d. = nem mérhető (88).

A CYP3A7-hez hasonlóan a 3A4 izoforma is csak az érett májszerű sejtekben jelenik meg. Az expressziós szintje hasonló az alacsony passzázsszámú HepG2 kontroll mintában mért értékhez, ugyanakkor körülbelül 4-szer, illetve 300-szor alacsonyabb, mint a HepaRG és a felnőtt májminták esetében mért értékek. Az ABC transzporterek kifejeződését vizsgálva megállapítottuk, hogy a májra jellemző gének expressziója általánosságban megnőtt. Emelkedett szintet mértünk az ABCA1 esetében, amely a differenciáció elején még egyáltalán nem volt jelen a mintáinkban az érett májszerű mintákban, viszont a szöveti mintákhoz hasonló értékeket mértünk. Az ABCB alcsaládba tartozó fehérjék közül azonban sem az ABCB1 (MDR1), sem az ABCB4 (MDR3) esetében nem tapasztaltunk érdemleges expressziót, pedig ezen transzporterek a felnőtt májban az epeúti kiválasztásban kitüntetett szereppel bírnak. Az epesavak szekrécijában kulcsfontosságú ABCB11 (BSEP) gén kifejeződését az érett májszerű stádiumban tudtuk először detektálni és a TUDCA kezeléssel kombinált szendvics tenyészet estében jelentősen megemelkedett expressziós szintet mértünk. Fontos azonban megjegyezni, hogy ez a szint még így is elmaradt a szöveti mintákban mért értékektől, azonban magasabb volt, mint a kontroll sejtek esetében. Az ABCC fehérjéket kódoló gének kifejeződését szinte minden esetben jól tudtuk detektálni az érett májszerű mintákban. Az epevezetéksejtekre és a májsejtekre egyaránt jellemző ABCC3

és a májsejtekre jellemző ABCC6 esetében a TUDCA kezeléssel kombinált szendvics tenyészet mintában még magasabb expressziós szintet detektáltunk. Érdeemes megjegyezni, hogy az epevezetéksejtekre jellemző ABCC7 (CFTR) kifejeződését is tudtuk detektálni a mintáink nagy részében, és hasonló szinten, mint a szöveti minták esetében. Az ABCG családba tartozó májban fontos gének közül az ABCG2-t jól tudtuk detektálni. Ennek szintje a differenciáció elején átmenetileg csökkent, azonban az érett májszerű állapotban újra megnőtt, és a felnőtt májra jellemző értékeket meghaladó szinten maradt. Érdekességképpen az ABCG5 és ABCG8 heterodimer fehérjéket kódoló gének kifejeződését egyáltalán nem tudtuk detektálni a mintáinkban. Az általunk vizsgált SLC fehérjéket kódoló gének közül az SLC10A1 (NTCP) és SLC22A1 (OCT1) kifejeződését jól tudtuk detektálni az érett májszerű állapotban. Érdekességképpen az SLC47A1 (MATE1) export pumpa és az SLCO1A2 (OATP1A2) uptake transzporter kifejeződését a HUES9 őssejtekben is tudtuk detektálni, valamint ezek szintje alig változott a differenciáció során. Az SLC22A2 (OCT2) szintén detektálható volt az őssejt állapotban, viszont a differenciáció során a kifejeződése átmenetileg lecsökkent, majd újra visszatért magasabb szintre a differenciáció végére. A májban fontos uptake transzporterek közül sem az SLCO1B1 (OATP1B1), sem az SLCO1B3 (OATP1B3) kifejeződését nem tudtuk detektálni a májirányú őssejt-differenciáció során.

Az expressziós adatok további vizsgálata során a dCt értékek alapján főkomponens analízist is végeztünk, amely egy hatékony eszköz az ilyen komplex adatok elemzéséhez. A főkomponens analízis egyik legnagyobb erőssége, hogy egy nagy adathalmaz dimenzióit lecsökkenti az adatokban fellelhető mögöttes szerkezet alapján, így kiemelve a legfontosabb változókat. Az első főkomponens az a dimenzió, amely a minták közötti varianciát legjobban magyarázza, a második pedig egy erre merőleges dimenzió, amely a lehetséges második legtöbb különbségért felel és így tovább. Esetünkben a főkomponens analízis megerősítette a klaszteranalízis eredményeit (**21. ábra**).



21. ábra Főkomponens analízis (PC) a minták génkifejeződési profilja alapján. Az ábrán az első (PC1, x tengely) és a második (PC2, y tengely) főkomponens mentén ábrázoltuk a minták eloszlását. A jelölők és a színek a kapcsolódó mintákat jelölik: kék rombuszok – őssejtek és a differenciálódott sejtek (világostól sötétkéig), lila négyzet – HepG2 sejtek, zöld háromszög – HepaRG sejtek, piros körök – májsejtek. Az időben egymást követő változásokat nyilakkal jelöltük. Rövidítések az ábrán: MEF = egér embrionális fibroblaszt; É. m. = érett májszerű; SW = szendvics tenyésztet; TUDCA; taurourszodeoxikolsav; AP = alacsony passzázs számú; MP = magas passzázs számú (88).

Az első két főkomponens (PC1-2) a tapasztalt variancia közel kétharmadát (65,6%) magyarázza. A PC1-et (51,6%) egyik oldalon főleg a pluripotenciáért felelős gének a POU5F1, SOX2, és CXCR4, valamint a másik oldalon a májmarker- az ALB, SERPINA1 (AAT), és CYP3A7 gének határozzák meg (**5. táblázat**). A PC2-öt (14%) elsősorban transzporter gének; OATP1B3, ABCB1, ABCC2-3, valamint korai máj- és őssejtmarker gének; AFP és GATA4 határozzák meg (**5. táblázat**). A minták elhelyezkedéséből a két főkomponens mentén jól követhető a májirányú őssejt-differenciáció folyamat. Az őssejt állapothoz közeli minták az ábra jobb oldalán csoportosulnak, majd a differenciációhoz

tartozó többi stádium mintái az ábra közepénél helyezkednek el, egyre jobban megközelítve a bal oldalt található májmintákat, amelyekhez legközelebb a HepaRG sejtek találhatóak. A különböző HepG2 mintákra jellemző kettősség a főkomponensek ábrázolása mentén is szembejövő. Míg az alacsony passzázsú minta a differenciált májsejtek közelében helyezkedik el, addig a magas passzázsú minden másik mintától távol áll. Érdeemes megjegyezni, hogy az általunk alkalmazott SW és TUDCA kezelés során kapott minták szorosan egymás mellett helyezkednek, és a kombinált (SW+TUDCA) minta is kis távolságra van tőlük. jól ábrázolva azt, hogy a kezelések hatására nem történik jelentős génkifejeződési változás.

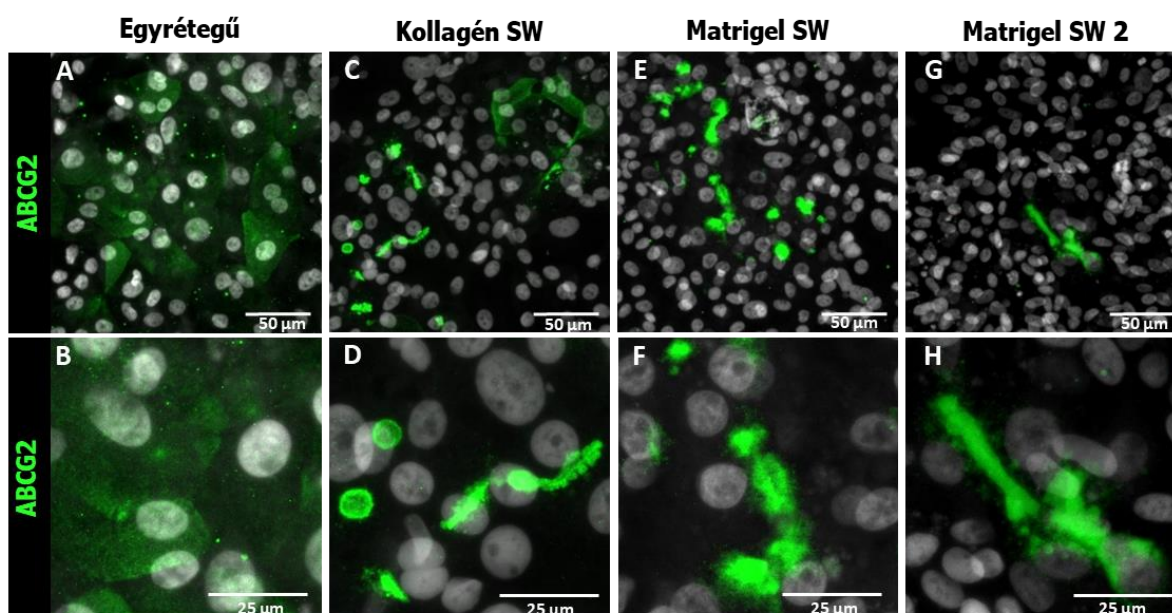
A részletes génexpressziós vizsgálatok eredményei alapján elmondhatjuk, hogy az általunk vizsgált májsejtekre jellemző gének kifejeződése legtöbb esetben megnőtt. A kontroll mintákhoz hasonlítva megállapítható, hogy az érett májsejtekre jellemző szintek általában elmaradnak a szöveti mintákban tapasztalható értékektől, viszont a májmodell sejtekhez viszonyítva hasonló, vagy azokat meghaladó értékeket mértünk. Az eredményeinkből az is látszik, hogy az általunk alkalmazott TUDCA kezelésnek és szendvics tenyésztésnek önmagában elenyésző hatása volt a gének expressziójára. A két kezelés kombinációjának is csak kevés gén esetében volt pozitív hatása azok kifejeződésére.

5. táblázat Az első két főkomponensen belül az egyes gének főkomponens-súlya (loadings) (88).

PC1: 51,6 %		PC2: 14 %	
gén	loadings	gén	loadings
POU5F1	-0,0968	SLCO1B3	-0,2566
SOX2	-0,0794	ABCB1	-0,2012
CXCR4	-0,0666	ABCA8	-0,1838
SOX17	-0,0480	ABCC3	-0,1713
KRT17	-0,0290	ABCC2	-0,1665
NANOG	-0,0279	SLCO1B1	-0,1490
SLCO1A2	-0,0249	KRT17	-0,1067
SLC22A2	-0,0228	SLC47A1	-0,0970
ABCG4	-0,0200	LDHA	-0,0937
GSC	-0,0139	SLC10A1	-0,0926
ABCC1	-0,0105	ABCA2	-0,0895
KRT18	-0,0053	TAP1	-0,0802
ABCA3	-0,0027	ABCB4	-0,0765
KRT7	-0,0020	TAP2	-0,0649
SOX1	0,0012	G6PD	-0,0631
ABCC4	0,0034	PPARA	-0,0578
CDH2	0,0048	ABCG5	-0,0553
LDHA	0,0092	ABCG1	-0,0523
G6PD	0,0119	ABCD1	-0,0494
ABCB7	0,0131	ABCG8	-0,0491
ABCC5	0,0142	CYP1A1	-0,0474
KRT8	0,0149	ABCB7	-0,0359
KRT19	0,0155	CYP51A1	-0,0356
ABCD4	0,0169	ABCA3	-0,0308
ABCB9	0,0171	ABCB6	-0,0232
ABCD1	0,0172	ABCG4	-0,0227
ABCC8	0,0186	ATP8B1	-0,0220
ABCC10	0,0220	ALB	-0,0181
ABCB8	0,0223	ABCD3	-0,0177
TAP2	0,0272	ABCC9	-0,0153
ABCG2	0,0333	ABCB10	-0,0126
ABCB5	0,0347	SOX1	-0,0110
TAP1	0,0349	ABCD2	-0,0098
ABCB10	0,0352	TAT	-0,0093
ABCA2	0,0384	ABCC1	-0,0090
ABCB6	0,0402	GSTK1	-0,0087
ABCA7	0,0472	SLC22A1	-0,0064
ABCD3	0,0475	ABCA6	-0,0009
CFTR	0,0478	ABCB9	0,0011
CYP51A1	0,0481	ABCB8	0,0022
SLC47A1	0,0496	KRT18	0,0024
GSTK1	0,0540	ABCA9	0,0055
FOXA2	0,0546	ABCC5	0,0058
ABCG1	0,0549	ARG1	0,0058
CDH1	0,0584	ASGR1	0,0070
ATP8B1	0,0598	ABCG2	0,0078
GATA4	0,0628	KRT8	0,0083
ABCA4	0,0702	CXCR4	0,0109
ABCA1	0,0852	ABCB5	0,0184
CYP1A1	0,0880	ABCC11	0,0230
HNF4A	0,0891	CEBPA	0,0307
PPARA	0,0902	ABCB11	0,0320
T	0,0944	ABCC6	0,0345
ABCD2	0,0958	CYP3A7	0,0375
CEBPA	0,0984	ABCC8	0,0378
ABCB1	0,1033	ABCC10	0,0379
ABCA10	0,1160	ABCC4	0,0392
CYP7A1	0,1165	ABCA7	0,0402
ABCC2	0,1221	ABCD4	0,0484
SLC22A1	0,1222	KRT7	0,0526
SLCO1B1	0,1282	ABCA4	0,0530
ABCC6	0,1332	CDH2	0,0658
ABCA12	0,1356	ABCA10	0,0761
ABCC11	0,1399	CYP7A1	0,0779
ABCC3	0,1418	POU5F1	0,0815
ABCB4	0,1464	SERPINA1	0,0828
ABCC9	0,1471	HNF1A	0,0938
SLCO1B3	0,1488	NANOG	0,1060
HNF1A	0,1503	ABCA12	0,1146
ABCA8	0,1551	T	0,1196
ARG1	0,1592	SOX17	0,1217
TAT	0,1604	HNF4A	0,1260
ABCB11	0,1671	TDO2	0,1283
ABCA9	0,1686	SLC22A2	0,1408
ASGR1	0,1768	ABCA1	0,1529
ABCG8	0,1787	GSC	0,1871
SLC10A1	0,1823	CDH1	0,1938
AFP	0,1864	CFTR	0,1969
TDO2	0,1889	FOXA2	0,2024
ABCG5	0,1894	KRT19	0,2038
ABCA6	0,2187	SLCO1A2	0,2126
CYP3A7	0,2412	GATA4	0,2352
SERPINA1	0,2801	SOX2	0,2556
ALB	0,3174	AFP	0,3796

4.6. Apikális és bazolaterális elhelyezkedésű membránfehérjék lokalizációjának és funkciójának vizsgálata különböző szendvics tenyésztési elrendezések között

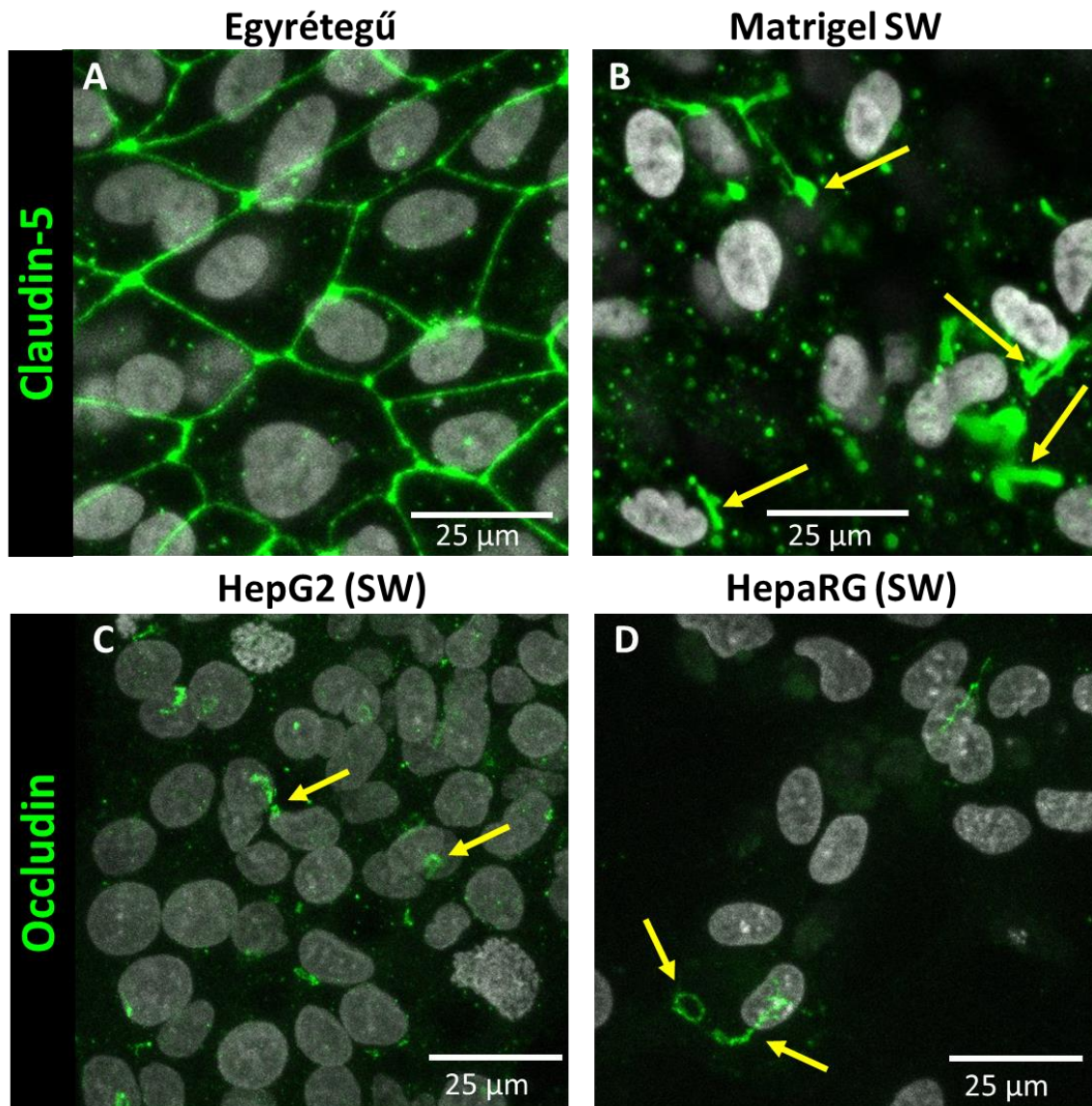
A szendvics tenyészetek esetében a sejtpolarizációra gyakorolt pozitív hatás miatt, a génkifejeződési szintek mellett fontosnak tartottuk fehérje lokalizációs szinten is megvizsgálni hatásukat. Ehhez a korábban alkalmazott töménységű Matrigel szendvics (SW) mellett egy alacsonyabb koncentrációjú Matrigel szendvicset (SW 2), valamint primer májsejtek kultúráiban alkalmazott patkány I-es típusú kollagén alapú szendvicset is kipróbáltunk (3.2.4). A génkifejeződési vizsgálatok eredményei alapján a meg kívántuk vizsgálni a szendvics tenyésztés hatását a transzporterek sejten belüli elhelyezkedésére. Elsősorban az ABCG2 fehérje vizsgálatát tűztük ki célul, mivel a fehérjét kódoló gén expressziója nagyságrendileg megegyezett a felnőtt májban található értékkel, néhány esetben meg is haladva azt. Emellett normál esetben az ABCG2 fehérje az érett, polarizált májsejtekben az apikális, membránban helyezkedik el, míg a polarizációját elvesztő májsejtekben egyenletesen oszlik el a sejten belül, így az elhelyezkedéséből következtetni tudunk a sejtek polarizáltságára. Kísérleteinkben immunfluoreszcens jelöléssel vizsgáltuk az ABCG2 fehérje elhelyezkedését és azt tapasztaltuk, hogy egyrétegű kultúra esetében a fehérje egyenletesen oszlott el a sejten belül, valamint a sejtmembránban (22. ábra A-B).



22. ábra Az ABCG2 membránfehérje lokalizációja érett májszerű állapotban különböző tenyésztési elrendezésekben. A mintákon a sejtmagok szürke színnel, míg az ABCG2 zöld színnel szerepel. Az ABCG2-t immunfluoreszcens módszerrel, a sejtmagokat pedig DAPI-val jelöltük. A bemutatott ábrák a látótérrel készült z-szeletek maximális intenzitás projekciójával készültek. Az alsó sor felvételei a felső sorban látható képekből kinagyított részleteket mutatnak. Rövidítések az ábrán: SW = szendvics tenyészet 0,325 mg/ml kollagén, Matrigel SW 0,25, SW 2 0,05 mg/ml A mércse fent 50μm-t, lent 25 μm-t jelöl (88).

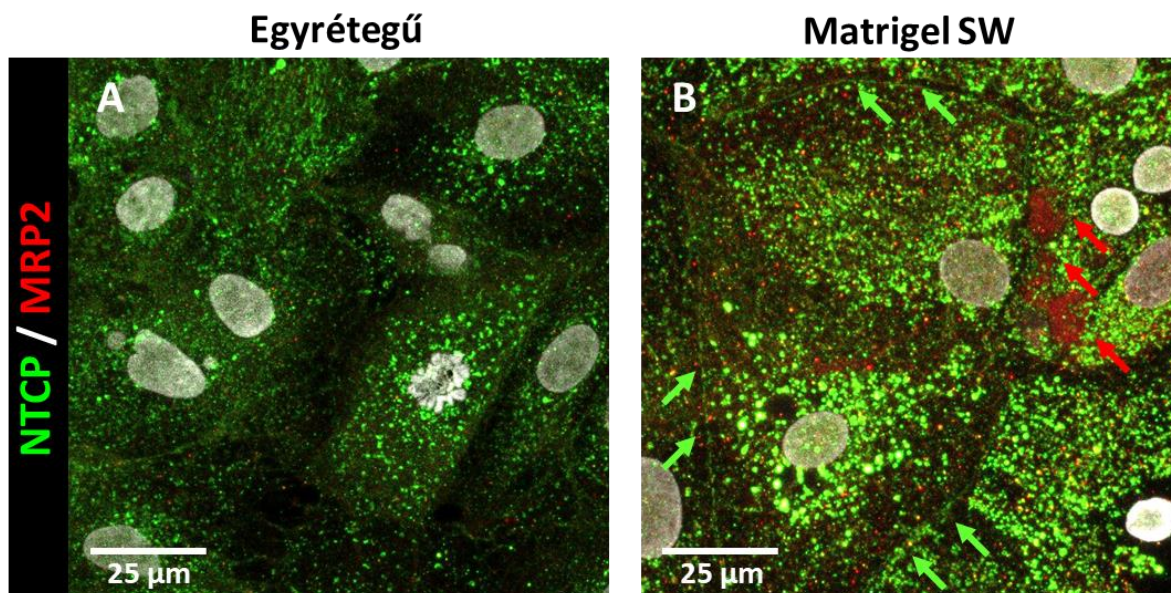
Ezzel szemben a szendvics tenyészetben differenciálódott mintákban a sejthatárok közelében mutatott erős feldúsulást a fehérje, függetlenül az alkalmazott fedőréteg anyagától és koncentrációjától (**22. ábra C-H**). Ezen struktúrák mintázata leginkább szemi-kanalikusokra, valamint kanalikusokra hasonlítottak a májsejtszerű sejtek esetében. A szemi-kanalikusok kettő vagy több sejt találkozásánál létrejövő képletek, amelyek egyszerű kör alakú megjelenéssel rendelkeznek. Ezzel szemben a kanalikusok megjelenése a kultúrákban, amely több sejt által együttesen kialakított hosszúkas, elnyúlt struktúrákban jelenik meg, magasabb fokú polarizáltságra utalnak. Mindkét kanalikusforma kialakításában elengedhetetlen szerepet játszanak a tight junction kialakításáért felelős kapcsolófehérjék. Ebből kifolyólag megvizsgáltuk a differenciáltatott érett májszerű mintáinkban, valamint a HepG2 és HepaRG kontroll sejtekben is különböző tight junction fehérjék kifejeződését (**23. ábra**). A differenciáltatott minták esetében, a korábbi munkánk eredményeire támaszkodva (138), a claudin-5 fehérje kifejeződését vizsgáltuk egyrétegű, illetve szendvics tenyészetekben immunfluoreszcens módszerrel (**23. ábra A-B**). A claudin-5 jelenlétét minden esetben tudtuk detektálni, azonban szembevető volt a különbség a fehérje lokalizációjában. Míg az egyrétegű kultúra esetében a gyakorlatilag teljesen egyenletesen helyezkedett el a sejtmembránban a fehérje, addig a szendvics tenyészetben hasonló elhelyezkedést figyeltünk meg, mint az ABCG2 fehérje esetében. Elsősorban több sejt kapcsolódási pontján halmozódott fel a claudin-5 és az elhelyezkedése alapján szemi-kanalikuláris és kanalikuláris struktúra is kirajzolódott, utalva a sejtek polarizációjára. A kontroll sejtek közül a HepG2 sejtek esetében a claudin-5 kifejeződését nem tudtuk detektálni, feltehetően a hepatocelluláris karcinóma eredetének következtében (138). A kontroll sejtek esetében ezért az occludin kifejeződését néztük, amely igazoltan kifejeződik a HepG2 sejtek esetében is (154,155), szintén immunfluoreszcens módszerrel (**23. ábra C-D**). Mind a HepG2, mind a HepaRG sejtek esetében polarizált elhelyezkedést mutatott a fehérje, azonban ezek a struktúrák zömében

szemi-kanalikulusokra emlékeztettek és csak kevés kisméretű kanalikuluszerű képletet találtunk.



23. ábra Kanalikuluszerű struktúrák kialakulása szendvics tenyésztés hatására. A differenciáltatott érett májszerű sejtek egyrétegű (A) vagy Matrigel szendvics (0,25 mg/ml) (B) kultúrában nőttek és immunfluoreszcens módszerrel claudin-5 (zöld) tight junction fehérjét jelöltünk. Kontrollként Matrigel szendvicsben (0,25 mg/ml) tenyésztett alacsony passzázsszámú HepG2 (C) és HepaRG (D) sejteket használtunk és szintén egy tight junction fehérjét, occludint (zöld) jelöltünk immunfluoreszcens módszerrel. A sejtmagokat (szürke) minden esetben DAPI-val jelöltük. A bemutatott ábrák a látótérrel készült z-szeletek maximális intenzitás projekciójával készültek. A sárga nyilak kanalikuluszerű lokalizációt jelölnek. A mércé 25 µm-t jelöl (88).

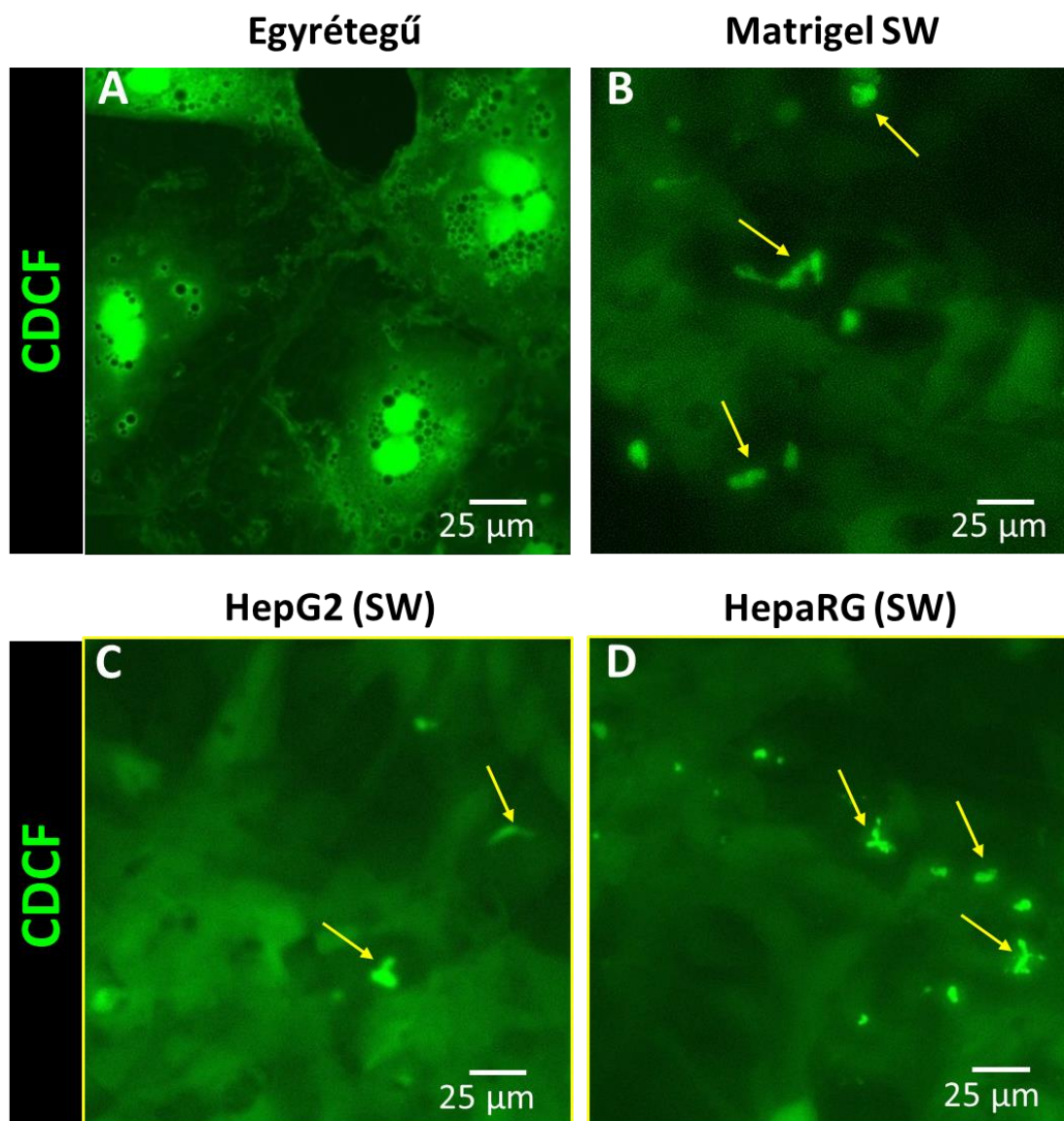
Az eredményeken ismeretében tovább vizsgáltuk a sejtek polarizáltságát és megvizsgáltuk az ABCC2 (MRP2) és az SLC10A1 (NTCP) elhelyezkedését az egyrétegű, illetve szendvics tenyészetben differenciáltatott érett májszerű sejtekben. Az MRP2 a májsejtek apikális (kanalikuláris) membránjában helyezkedik el, ezzel szemben az NTCP a bazolaterális membránban lokalizálódik. Eredményeink (24. ábra) alapján elmondható, hogy az az



24. ábra Az NTCP (SLC10A1) és az MRP2 (ABCC2) transzporterek elhelyezkedése egyrétegű (A) és Matrigel szendvics (0,25 mg/ml) (B) tenyészetben differenciáltatott érett májszerű sejtekben. Az NTCP-t (zöld) és az MRP2-t (piros) immunfluoreszcens módszerrel, a sejtmagokat (szürke) pedig DAPI-val jelöltük. A bemutatott ábrák a látótérrel készült z-szeletek maximális intenzitás projekciójával készültek. A zöld nyilak bazolaterális, míg a piros nyilak kanalikulusszerű lokalizációt jelölnek. A mérce 25 μm -t jelöl (88).

egyrétegű kultúrában képkalkotó módszerrel nem sikerült igazolni az MRP2 fehérje jelenlétét (24. ábra A). Az NTCP fehérje jelen volt a mintákban, ugyanakkor a sejteken belül diffúzan helyezkedett el, és sejthatároló membránrész nem rajzolódott ki. A szendvics tenyészet esetében viszont mindkét fehérje jelenlétét tudtuk detektálni. Az MRP2 esetében a fehérje kanalikulusszerű struktúrában halmozódott fel leginkább és megtalálható volt a sejten belül is. Az NTCP esetében a sejten belül hasonló elhelyezkedést detektáltunk, mint az egyrétegű kultúra esetében, azonban jól kivehetően megjelent a bazolaterális membránban is, kirajzolva a sejtek határát. Az MRP2 (ABCC2) transzporter működését is megvizsgáltuk CDCFDA esszét végezve. A CDCFDA egy olyan membránpermeábilis festék, amely színtelen és nem képes fluoreszcenciára, egészen addig, amíg a sejten belüli észterázok le

nem hasítják a diacetát csoportot. Ha ez megtörtént a visszamaradó CDCF molekula már fluoreszcens és elsősorban az MRP2 fehérje felel a sejtől való kipumpálásáért (25. ábra).



25. ábra A szendvics tenyésztés hatása a CDCF kipumpálására. Az érett májszerű sejteket egyrétegű kultúrában (A), illetve Matrigel szendvicsben (0,25 mg/ml) differenciáltattuk (B). Kontrollként Matrigel szendvicsben (0,25 mg/ml) tenyésztett HepG2 (C) és HepaRG (D) sejteket használtunk. A képeken a CDCF saját fluoreszcenciája látszik. A sárga nyilak kanalikulusszerű struktúrákat jelölnek. A mérce 25 µm-t jelöl (88).

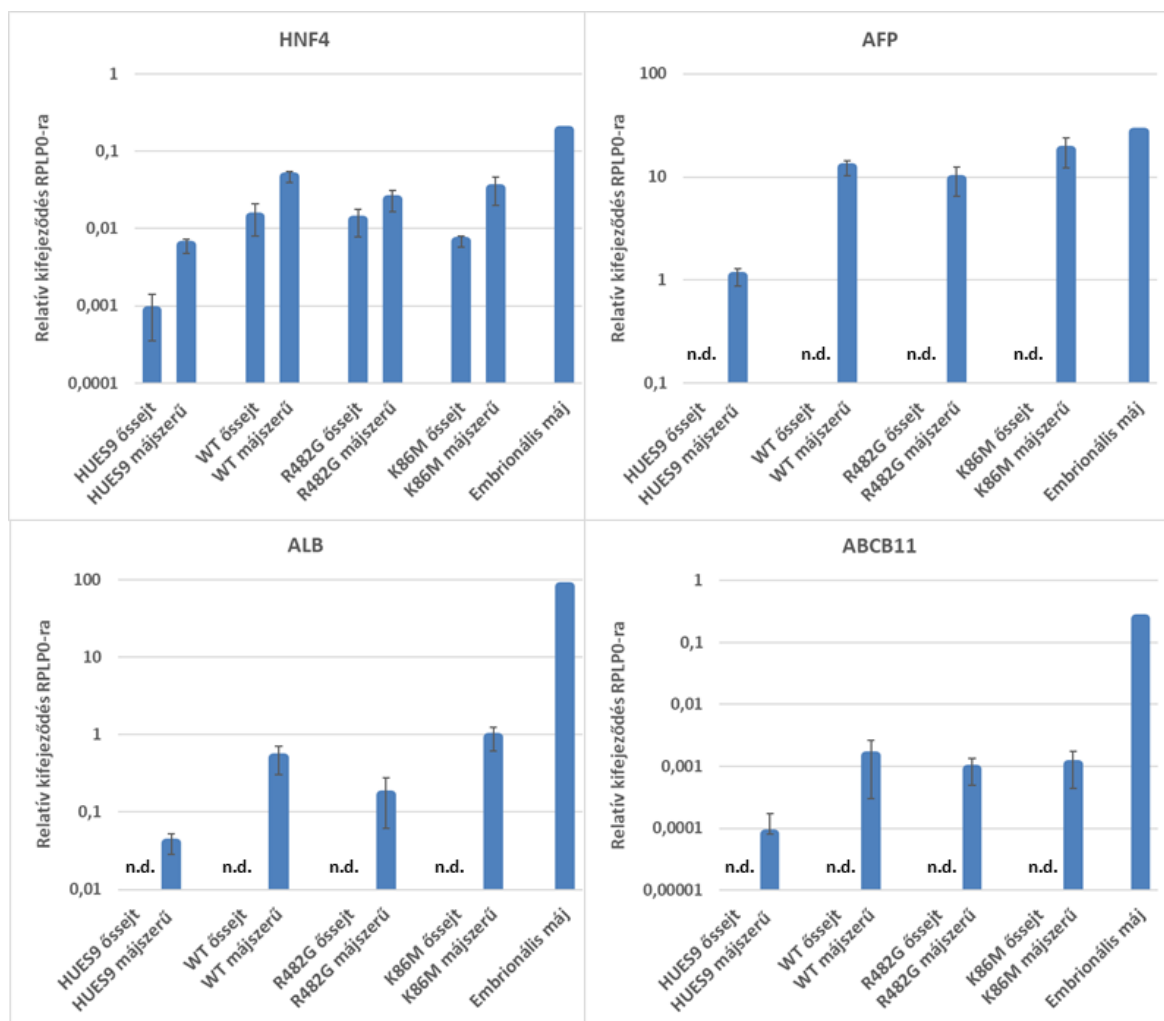
Amennyiben egyrétegű tenyészetben differenciáltatott sejtekhez adtuk a festéket, akkor csak sejten belül tudtuk detektálni a CDCF fluoreszcenciáját (25. ábra A). Ezzel szemben a szendvics kultúrában azt tapasztaltuk, hogy a fluoreszcencia sejten belül nagymértékben lecsökkent és vele párhuzamosan megnőtt szemikanalikulus, és kanalikulusszerű struktúrákban, jelezve a festék felhalmozódását a sejtek közötti térben (25. ábra B). A kontroll mintákat szintén szendvics tenyészetben vizsgáltuk és azt tapasztaltuk, hogy a

CDCF a sejteken belül, valamint szemikanalikulus-szerű struktúrákban is felhalmozódik (**25. ábra C-D**). A differenciáltatott sejtek esetében történt megfigyelés összhangban van a korábbi eredményünkkel az MRP2 lokalizációjáról (**24. ábra**), és egyértelműen mutatja, hogy a polarizációt elősegítő tenyésztési körülmények szükségesek nem csak a transzporterek megfelelő elhelyezkedéséhez, de azok funkciójához is. A kontroll sejtekkel történő összehasonlítás alapján az is látható, hogy az érett májszerű sejtek hajlamosabbak hosszabb, kanalikulus-szerű struktúrák formálására (**22., 23., 25. ábra**). **A vizsgálataink alapján megállapítható, hogy a szendvics tenyésztési elrendezés a májmarker gének kifejeződésére alig van pozitív hatással, ezzel szemben a májsejtszerű sejtek polarizációjának elősegítésében kulcsszerepe van. Ebből kifolyólag pozitív hatással van például a transzporterek megfelelő lokalizációjára és működésére is.**

4.7. GFP-vel címkézett különböző ABCG2 variánsokat stabilan kifejező genetikailag módosított HUES9 őssejtvonalak májirányú differenciációjának vizsgálata.

Munkánk során lehetőségünk volt bekapcsolódni a Pluripotens Őssejt laboratóriumban folyó, genetikailag módosított HUES9 sejtek vizsgálatával foglalkozó kísérletekbe. Ebben a munkában olyan GFP-vel címkézett ABCG2 fehérjét túlexpresszáló őssejtvonalakat vizsgáltunk, amelyek az ABCG2 fehérje működésének köszönhetően védettebbek különböző toxinokkal, és környezeti stresszel szemben. A GFP címkézésnek köszönhetően pedig követni lehet a fehérje kifejeződését, sejten belüli bolyongását, valamint lokalizációját, akár *in vivo* környezetben is. A GFP-vel fuzionált ABCG2 fehérjével kapcsolatban korábbi kutatások igazolták, hogy Sleeping Beauty transzpozonos rendszerrel stabilan kifejeződő humán pluripotens sejt vonalakat lehet létrehozni, valamint a fehérje teljes mértékben funkcióképes és megfelelően fejeződik ki különböző sejt típusokban (156,157). Munkánk során a vad típusú (WT) ABCG2 fehérje mellett egy szubsztrát mutáns R482G, valamint egy funkcionálisan inaktív K86M variáns GFP fúziós változatát is vizsgáltuk. Az R482G-ABCG2 variánsról korábban kimutatták, hogy a WT-hoz képest eltérő szubsztrát felismeréssel és szabályozási tulajdonsággal rendelkezik, amelyek eredményeként megnövekedett ellenállással rendelkezik különböző toxikus vegyületekkel szemben (158,159). Munkánk során célunk volt meghatározni a létrehozott genetikailag módosított HUES9 sejt vonalak májirányú differenciációs képességét. Ehhez a korábban bemutatott differenciációs eljárást használtuk, azonban kiegészítő kezeléseket nem alkalmaztunk (SW tenyészet, TUDCA). A differenciáltatott májsejtszerű sejtekből RNS

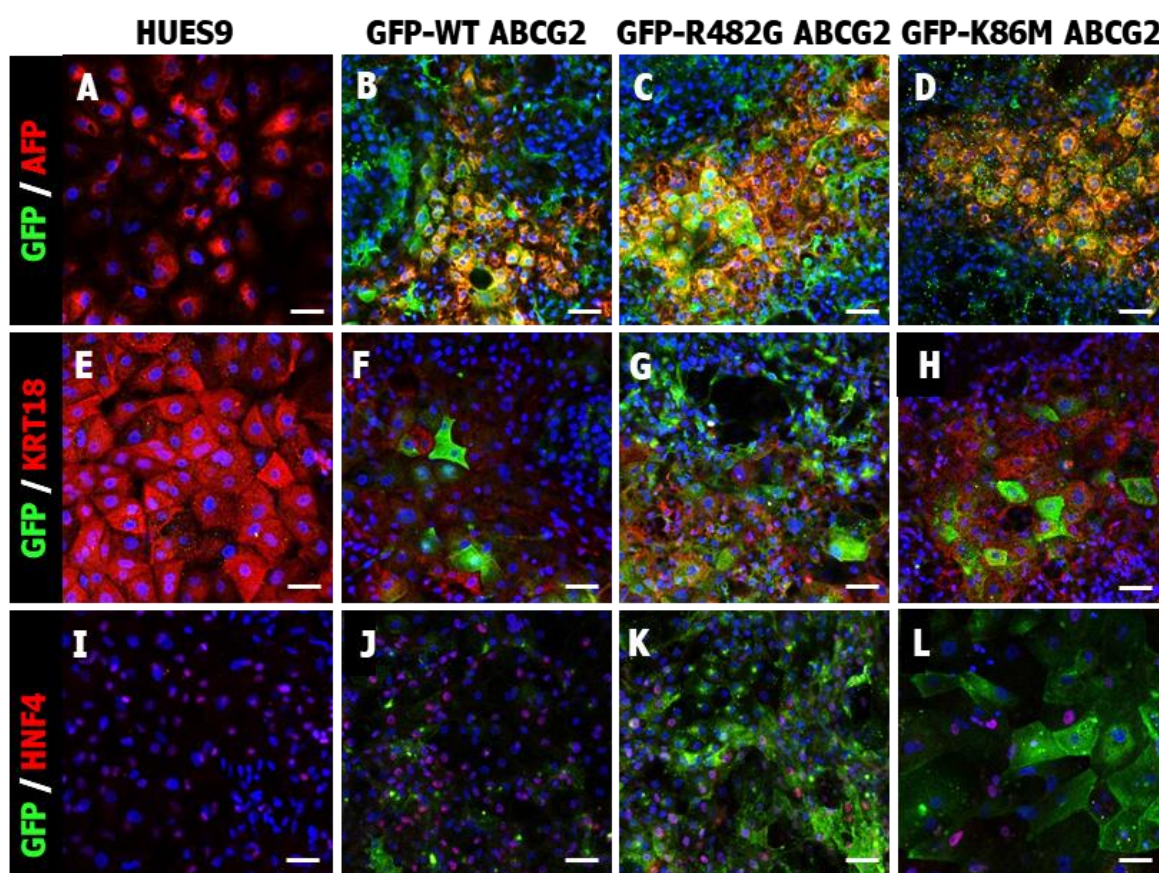
izolálás és cDNS átírást követően qRT-PCR-rel meghatároztuk négy májspecifikus gén (AFP, albumin, ABCB11, HNF4) kifejeződését (26. ábra).



26. ábra Májspecifikus gének kifejeződésének vizsgálata qPCR-rel különböző őssejtvonalakból differenciáltatott májsejtű sejtekben. A HUES9 a parentális őssejtvonalat a WT, R482G, K86M pedig a GFP-vel címkézett különböző ABCG2 variánsokat kifejező genetikailag módosított HUES9 őssejtvonalakat jelöli. A hibásávok S.D. értékeket jelölnek (n=2). n.d. = nem mérhető (92).

Eredményeink azt mutatták, hogy a vizsgált gének kifejeződése megnőtt a differenciáció végére, amiből arra lehet következtetni, hogy sikeresen lezajlott a májirányú átalakulás és a kultúrában nagyrészt májsejtű sejtek keletkeztek. Összességében elmondható, hogy a genetikailag módosított minták között a génkifejeződések tekintetében nem találtunk szignifikáns különbségeket. A kontrollként használt embrionális májsejtű gének kifejeződéséhez viszonyítva gyakorlatilag pontosan azokat az arányokat kapjuk meg, mint a korábbi differenciáltatásaink során kaptunk (4.5.; 4. táblázat). Fontos megjegyezni, hogy a differenciációs kontrollként használt, genetikailag nem módosított HUES9 sejtek vonatkozó génkifejeződési értékei körülbelül egy nagyságrenddel alacsonyabbak voltak a

genetikailag módosított társaik-, és a korábbi differenciációink eredményeitől. Ez feltehetőleg azért volt így, mert a májirányú differenciáció indításakor ezen a sejtek passzázsszáma sokkal magasabb volt a korábbi differenciáltatásokkor használt sejteknél, míg a genetikailag módosított sejteké átlagában megegyezett azokkal. Ez a nem elhanyagolható biológiai különbség kedvezőtlenül befolyásolhatja a differenciálhatóságot. A génkifejeződési vizsgálatok mellett megvizsgáltuk a transzgén és több májsejt specifikus fehérje kifejeződését is. A kísérleteinkben immunfluoreszcensen jelöltük a célfehérjéinket és konfokális mikroszkópi képalkotással vizsgáltuk meg a kifejeződésüket, és lokalizációjukat a differenciálódott májsejtszerű sejteken (**27. ábra**). Az eredményekből



27. ábra Májspecifikus markerek és a GFP-vel címkézett különböző ABCG2 variánsok kifejeződésének vizsgálata érett májszerű sejtekben immunfluoreszcens jelöléssel. A vizsgált sejtvonalakat a képoszlopok fölött, míg a vizsgált markereket a sorok elején jelöltük. Az első sorban (A-D) a GFP (zöld) és az AFP (piros), a második sorban (E-H) a GFP (zöld) és a keratin 18 (piros), míg a harmadik sorban (I-L) a GFP (zöld) és a HNF4 (piros) lokalizációját láthatjuk. A sejtmagokat DAPI-val festettük és az ábrákon kék színnel jelöltük. A bemutatott ábrák a látótérrel készült z-szeletek maximális intenzitás projekciójával készültek. A mérce 50 μm -t jelöl (92).

kiolvasható, hogy az AFP a sejtek többségében kifejeződik (**27 ábra A-D**). A transzgénünk meglétét GFP festéssel ellenőriztük, és azt tapasztaltuk, hogy a differenciáció végén minden transzgenikus sejtvonalban megtalálható volt a kifejeződése, valamint az AFP pozitív sejtek

mindegyike kifejezte a transzgént is. A KRT18 vázfehérje jelenlétét vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy minden differenciáltatott sejtvonalon kifejeződött (27. ábra E-H), csakúgy, mint a májirányú differenciáció egyik kulcsfehérjeje a HNF4 (27. ábra I-L). Fontos megjegyezni, hogy a bevitt GFP-ABCG2 transzgént kifejező sejtek döntő többsége kifejezte a vizsgált májmarker fehérjéket. **Eredményeink alapján elmondható, hogy az általunk vizsgált genetikailag módosított, GFP-vel címkézett ABCG2 különböző variánsait stabilan kifejező HUES9 őssejtvonalak májirányú differenciálhatósága nem változott meg.** A transzgén kifejeződése a differenciálódott májsejtszerű sejtekben is detektálható volt és ezekre a sejtekre mRNS és fehérje alapon is jellemző volt a májmarkerek kifejeződése. Ugyanakkor fontos kiemelni, hogy ezek a sejtvonalak több szempontból is hasznosak lehetnek további kutatásokban. Egyrészt az ABCG2 túlexpressziója ellenére az őssejtekre jellemző önmegújító és differenciálhatósági tulajdonságaikban nem különböznek a többi humán pluripotens őssejtvonaltól, miközben a transzgénnek köszönhetően a sejtek ellenállóbbak a környezeti stresszhatásokkal és számos toxinnal szemben. Utóbbi tulajdonságuk a transzgén stabil kifejeződése miatt, a belőlük differenciáltatott sejtípusokra is jellemző marad. A differenciáltatott kardiomiociták esetében doxorubicin kezelés hatására az élő/halott sejtek aránya jelentősen megnő, jelezve, hogy a transzgént kifejező sejtek ellenállóbbak a doxorubicin kezeléssel szemben. A GFP-ABCG2 fúziós fehérje arra is kiváló lehetőséget nyújt, hogy fluoreszcencia alapon élő sejtekben is lehet tanulmányozni a fehérje elhelyezkedését. Ez a májirányú differenciáció esetében különös jelentőséggel bírhat, mivel a májsejtekben az ABCG2 fehérje az apikális membránban helyezkedik el, azonban ahogy a 22-25. ábrákon is látszik, egyrétegű tenyészetekben nem, csak a szendvics tenyészetekben alakul ki ez a jellegű polarizáltság. **Ezen genetikailag módosított sejtvonalknak alkalmazásával lehetőség nyílik valós időben követni a különböző sejt polarizációt módosító körülmények hatását a differenciálódó sejteken, valamint a sejt polarizáció kialakulásában szerepet játszó folyamatok részletesebben vizsgálatára és megértésére is lehetőséget nyújt az ABCG2 fehérje apikális membránba történő kijutásának követésén keresztül.**

5. ÖSSZEFOGLALÓ

A humán pluripotens őssejtek májirányú differenciációja során végbemenő változásokról, különösen a számos májfunkció ellátásában megkerülhetetlen ABC fehérjékről, a keletkező sejtek polarizáltságáról, valamint érettségéről viszonylag kevés információ áll rendelkezésünkre. Doktori munkám során ezért célul tűztem ki; i) a membránfehérjéket (főként az ABC fehérjéket) kódoló géneknek a differenciáció során történő kifejeződésének vizsgálatát; ii) a keletkező sejtek különböző májsejtekkel való összehasonlítását; illetve iii) a sejtpolarizáció hatásának elemzését. A főbb eredmények a következők:

1. Sikeresen differenciáltattunk májirányba HUES9, valamint genetikailag módosított HUES9 humán embrionális őssejteket az ezen sejtvonalakhoz hozzáigazított differenciációs protokollal. Igazoltuk, hogy a keletkezett sejtek mindenben megfelelnek a széles körben alkalmazott májsejtszerű sejtekre vonatkozó alapkövetelményeknek.

2. Az általunk tervezett qPCR-alapú vizsgálati módszer segítségével kimutattuk, hogy az őssejt-eredetű májsejtszerű sejtek kifejezik a májra jellemző markerek és transzporterek legtöbbjét, gyakran magasabb szinten, mint az általánosan használt máj modellsejtek, ugyanakkor az embrionális és felnőtt májmintákra jellemző értékektől elmaradnak. Eredményeink rávilágítanak arra, hogy a HepG2 máj modellsejt expressziós profilja a tenyésztés során drasztikusan átalakul, és elveszti a májsejtekre jellemző karkaterjegyeket.

3. Több fontos markerfehérje kifejeződését és sejten belüli elhelyezkedését is megvizsgáltuk. Eredményeink arra utalnak, hogy a keletkezett sejtek egyszerre rendelkeznek májsejt és epevezetéksejt karakterrel.

4. Megvizsgáltuk a sejtpolaritást elősegítő szendvics tenyésztési körülmények és az epesóval kiváltott szelekciós nyomás hatását az őssejt-eredetű májsejtszerű sejtek érésére. Eredményeink azt mutatják, hogy a kezeléseknek elenyésző hatása van a génkifejeződésre, ugyanakkor a szendvics tenyészetek nagymértékben elősegítik a megfelelő sejtpolarizáció kialakulását, valamint a májtranszporterek megfelelő lokalizációját és funkcióját. A qPCR és a mikroszkópos vizsgálatok eredményeink alapján megállapíthatjuk, hogy az őssejt-differenciációk során keletkező heterogén sejtpopulációban nem elégséges csak génkifejeződési vagy fehérjeszint változásokat vizsgálni, fontos követni a lokalizációban és a funkcióban történő változásokat is.

5. Végezetül eredmények rávilágítanak arra, hogy az irodalomban alkalmazott kritériumok nem elégségesek egy megbízható őssejt-eredetű májmodell megítéléséhez, és nagyobb hangsúlyt kell fektetni a toxikológiai és farmakológiai szempontból fontos transzporterek kifejeződésére, funkciójára, valamint megfelelő lokalizációjára.

6. SUMMARY

Relatively limited information is available on the changes during hepatic differentiation of human pluripotent stem cells, especially on ABC proteins essential for hepatic functions, as well as on the polarization and maturity of the progeny cells. Therefore, the goals of the study presented in my dissertation includes; i) monitoring the gene expression levels of membrane proteins (with focus on ABC transporters) during the hepatic differentiation; ii) comparison of the derived cells with different liver cells; and iii) analysis of the effect of cell polarization. The main results are as follows:

1. We successfully differentiated HUES9, as well as genetically engineered HUES9 human pluripotent stem cells toward the hepatic lineage with differentiation protocol adapted to these particular cell lines. We have demonstrated that the stem cell-derived cells meet the widely accepted requirements for hepatocyte-like cells in all aspects.
2. Using an own-designed qPCR-based hepatic differentiation-specific assay, we showed that the differentiated hepatocyte-like cells express most of the liver-specific markers and transporters often at higher levels than the commonly used liver model cells, nevertheless, typically at lower levels as compared to embryonic and adult liver samples. Our results also revealed a substantial change in the expression profile of HepG2 liver model cells in culture and the significant loss of their liver character.
3. The expression and intracellular localization of several important marker proteins were also assessed. Our results suggest that the differentiated cells have a dual, hepatocyte-cholangiocyte character.
4. We also examined the effect of sandwich culture conditions promoting cell polarization and the bile salt-induced selection pressure on the maturation of the stem cell-derived hepatic cells. Our results show that the treatments have a minor effect on gene expression, however, sandwich cultures greatly facilitate the establishment of cell polarity, promote the development of proper cellular polarization as well as the proper localization and function of hepatic transporters. Our qPCR and microscopy results revealed that investigation of mRNA or protein expressions in the heterogeneous cell populations is not satisfactory, but assessment of changes in the localization and function is also necessary.
5. As a conclusion of our observations, we suggest that conventional criteria for the evaluation of the quality of stem cell-derived hepatocyte-like cells are not sufficient and ought to be augmented with additional elements, such as polarized and functional expression of toxicologically and pharmacologically important hepatic transporters.

7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretnék köszönetet mondani szüleimnek **Török Györgynek** és **Török Györgynének**, valamint testvéremnek **dr. Holu-Török Edinának** a szeretetteljes és példamutató támogatásukért. Köszönöm a gyermekeimnek, **Török Alíz**nak és **Márton**nak, hogy mosolyukkal és szeretetükkel mindig átlendítettek a nehéz időszakokon és hogy emlékeztettek arra, hogy nem csak tenni, de élvezni is kell a dolgainkat. Köszönöm feleségemnek **Törökné Ács Veronikának** a kitartását és a teljes támogatását, amivel igazi társként segített abban, hogy a dolgozat elkészülhessen.

Nagy hálával szeretnék köszönetet mondani **dr. Homolya Lászlónak**, témavezetőmnek, hogy a doktori éveim alatt biztosította a szakmai fejlődésemhez a feltételeket és támogatott a kutatói pályámon.

Köszönettel tartozom **dr. Apáti Ágotának**, és **dr. Sarkadi Baláznak**, hogy mindig nyitottan álltak hozzám, és hogy tanulhattam tőlük az együtt töltött évek során. Ágotának nagyon köszönöm, hogy minden helyzetben megértően támogatott és előremozdított. Köszönettel tartozom az Össejtlabor egykori és mostani tagjainak azért a kedves légkörért, amiben együtt dolgozhattunk az elmúlt években. Köszönöm **dr. Erdei Zsuzsának**, hogy az össejt tenyésztés alapjait megtanította, és az inspiráló beszélgetéseinket. Köszönöm **Lilienberg Juliannának** és **Kosóczki Évának**, a volt szakdolgozóimnak a közös eredményeket, valamint az együtt eltöltött időt, amely alatt megtanulhattam és megismerhettem a szakmai ismeretek átadásának fortélyait és fontosságát.

Szeretném megköszönni **Bézsényi Gyöngyinek** és **Haraszi Beának** a rendkívül precíz és áldozatos munkájukat, amivel segítettek nekem a kísérletek kivitelezésében.

Szeretném megköszönni a szakmai támogatását **dr. Orbán Tamásnak**, és **dr. Uher Ferencnek**, akik tanácsaira mindig számíthattam. Köszönet illeti meg az Enzimológiai Intézet összes tagját, köszönöm az inspiráló Mátraházai konferenciákat, a munkabeszámolókat, az Immunkavékat és az Össejt klubokat, és azt a szakmai felhőt, amiben nagyon sokat tanulhattam az évek során. Köszönöm **dr. Kellermayer Miklósnak** és **dr. Kiss Baláznak** a támogatását a doktori munkám elkészítéséhez.

Köszönöm **Rieth Katának**, **Lesti Juditnak** és **Andrási Zsuzsinak** a sok-sok éves szeretetteljes és lelkiismeretes munkájukat.

8. IRODALOMJEGYZÉK

1. Arias IM, Alter HJ, Boyer JL, Cohen DE, Fausto N, Shafritz DA, és mtsai. *The Liver: Biology and Pathobiology: Fifth Edition*. The Liver: Biology and Pathobiology: Fifth Edition. John Wiley and Sons; 2009. 1–1191 o.
2. Rose KA, Holman NS, Green AM, Andersen ME, LeCluyse EL. Co-culture of Hepatocytes and Kupffer Cells as an In Vitro Model of Inflammation and Drug-Induced Hepatotoxicity. *J Pharm Sci*. 2016. február;105(2):950–64.
3. Jemnitz K, Bártai-Konczos A, Szabó M, Ioja E, Kolacsek O, Orbán TI, és mtsai. A transgenic rat hepatocyte - Kupffer cell co-culture model for evaluation of direct and macrophage-related effect of poly(amidoamine) dendrimers. *Toxicol Vitro*. 2017. február;38:159–69.
4. Bártai-Konczos A, Veres Z, Szabó M, Ioja E, László G, Török G, és mtsai. Comparative study of CYP2B1/2 induction and the transport of bilirubin and taurocholate in rat hepatocyte-mono- and hepatocyte-Kupffer cell co-cultures. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2016. november;82:1–8.
5. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *Köt. 275, Journal of Biological Chemistry*. 2000. o. 2247–50.
6. Blouin A. Distribution of organelles and membranes between hepatocytes and nonhepatocytes in the rat liver parenchyma. A stereological study. *J Cell Biol*. 1977. február 1.;72(2):441–55.
7. Boyer JL. Bile formation and secretion. *Compr Physiol*. 2013;3(3):1035–78.
8. Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: Critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*. 2010;176(1):2–13.
9. Kovács T, Máthé D, Fülöp A, Jemnitz K, Bártai-Konczos A, Veres Z, és mtsai. Functional shift with maintained regenerative potential following portal vein ligation. *Sci Rep*. 2017. december 22.;7(1):18065.
10. Rui L. Energy metabolism in the liver. *Compr Physiol*. 2014;4(1):177–97.
11. Flatt JP. Use and storage of carbohydrate and fat. *Am J Clin Nutr*. 1995;61(4 Suppl):952S-959S.

12. McNurlan MA, Tomkins AM, Garlick PJ. The effect of starvation on the rate of protein synthesis in rat liver and small intestine. *Biochem J.* 1979;178(2):373–9.
13. Olson JP, Miller LL, Troup SB. Synthesis of clotting factors by the isolated perfused rat liver. *J Clin Invest.* 1966. május;45(5):690–701.
14. Da Silva RP, Nissim I, Brosnan ME, Brosnan JT. Creatine synthesis: Hepatic metabolism of guanidinoacetate and creatine in the rat in vitro and in vivo. *Am J Physiol - Endocrinol Metab.* 2009. február;296(2):E256.
15. Pasantés-Morales H, Chatagner F, Mandel P. Synthesis of taurine in rat liver and brain in vivo. *Neurochem Res.* 1980. április;5(4):441–51.
16. Vilstrup H. Synthesis of urea after stimulation with amino acids: Relation to liver function. *Gut.* 1980. november;21(11):990–5.
17. Sjögren K, Liu JL, Blad K, Skrtic S, Vidal O, Wallenius V, és mtsai. Liver-derived insulin-like growth factor I (IGF-I) is the principal source of IGF-I in blood but is not required for postnatal body growth in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999. június 8.;96(12):7088–92.
18. Anwer MS, Stieger B. Sodium-dependent bile salt transporters of the SLC10A transporter family: more than solute transporters. *Pflugers Arch.* 2014. január;466(1):77–89.
19. Hagenbuch B, Stieger B, Foguet M, Lübbert H, Meier PJ. Functional expression cloning and characterization of the hepatocyte Na⁺/bile acid cotransport system. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991. december 1.;88(23):10629–33.
20. Hagenbuch B, Meier P. Sinusoidal (Basolateral) Bile Salt Uptake Systems of Hepatocytes. *Semin Liver Dis.* 1996. március 17.;16(02):129–36.
21. Gerets HHJ, Tilmant K, Gerin B, Chanteux H, Depelchin BO, Dhalluin S, és mtsai. Characterization of primary human hepatocytes, HepG2 cells, and HepaRG cells at the mRNA level and CYP activity in response to inducers and their predictivity for the detection of human hepatotoxins. *Cell Biol Toxicol.* 2012. április;28(2):69–87.
22. Rius M, Nies AT, Hummel-Eisenbeiss J, Jedlitschky G, Keppler D. Cotransport of reduced glutathione with bile salts by MRP4 (ABCC4) localized to the basolateral hepatocyte membrane. *Hepatology.* 2003. augusztus;38(2):374–84.

23. Nies AT, Keppler D. The apical conjugate efflux pump ABCC2 (MRP2). *Pflügers Arch - Eur J Physiol.* 2007. január 29.;453(5):643–59.
24. Sarkadi B, Ozvegy-Laczka C, Németh K, Váradi A. ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett.* 2004. június 1.;567(1):116–20.
25. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoimmunity defense system. *Physiol Rev.* 2006. október 1.;86(4):1179–236.
26. Dean M, Hamon Y, Chimini G. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. Köt. 42, *Journal of Lipid Research.* Cold Spring Harbor Laboratory Press; 2001. o. 1007–17.
27. Liu X. ABC family transporters. In: *Advances in Experimental Medicine and Biology.* Springer New York LLC; 2019. o. 13–100.
28. Barbet R, Peiffer I, Hutchins JRA, Hatzfeld A, Garrido E, Hatzfeld JA. 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. április 15.;11(8):1611–20.
29. Apáti Á, Szebényi 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. január 2.;12(1):77–92.
30. Liang Y, Li S, Chen L. The physiological role of drug transporters. Köt. 6, *Protein and Cell.* Higher Education Press; 2015. o. 334–50.
31. Sarkadi B, Homolya L, Szakács G, Váradi A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: Participation in a chemoimmunity defense system. Köt. 86, *Physiological Reviews.* 2006. o. 1179–236.
32. Meyer Zu Schwabedissen HE, Kroemer HK. In vitro and in vivo evidence for the importance of breast cancer resistance protein transporters (BCRP/MXR/ABCP/ABCG2). Köt. 201, *Handbook of Experimental Pharmacology.* 2011. o. 325–71.
33. Briz O, Romero MR, Martínez-Becerra P, Macías RIR, Pérez MJ, Jiménez F, és mtsai.

- OATP8/1B3-mediated Cotransport of Bile Acids and Glutathione. *J Biol Chem*. 2006. október 13.;281(41):30326–35.
34. Briz O, Serrano MA, MacIas RIR, Gonzalez-Gallego J, Marin JJG. Role of organic anion-transporting polypeptides, OATP-A, OATP-C and OATP-8, in the human placenta-maternal liver tandem excretory pathway for foetal bilirubin. *Biochem J*. 2003. május 1.;371(Pt 3):897–905.
 35. Cui Y, König J, Leier I, Buchholz U, Keppler D. Hepatic Uptake of Bilirubin and Its Conjugates by the Human Organic Anion Transporter SLC21A6. *J Biol Chem*. 2001. március 30.;276(13):9626–30.
 36. van de Steeg E, Wagenaar E, van der Kruijssen CMM, Burggraaff JEC, de Waart DR, Elferink RPJO, és mtsai. Organic anion transporting polypeptide 1a/1b–knockout mice provide insights into hepatic handling of bilirubin, bile acids, and drugs. *J Clin Invest*. 2010. augusztus 2.;120(8):2942–52.
 37. Hagenbuch B, Meier PJ. Organic anion transporting polypeptides of the OATP/SLC21 family: Phylogenetic classification as OATP/SLCO super-family, new nomenclature and molecular/functional properties. *Köt. 447, Pflugers Archiv European Journal of Physiology*. 2004. o. 653–65.
 38. Jonker JW, Schinkel AH. Pharmacological and Physiological Functions of the Polyspecific Organic Cation Transporters: OCT1, 2, and 3 (SLC22A1-3). *Köt. 308, Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 2004. o. 2–9.
 39. Donner MG, Warskulat U, Saha N, Häussinger D. Enhanced expression of basolateral multidrug resistance protein isoforms Mrp3 and Mrp5 in rat liver by LPS. *Biol Chem*. 2004. január 13.;385(3–4):331–9.
 40. König J, Nies AT, Cui Y, Leier I, Keppler D. Conjugate export pumps of the multidrug resistance protein (MRP) family: localization, substrate specificity, and MRP2-mediated drug resistance. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 1999. december 6.;1461(2):377–94.
 41. Ros JE. ATP binding cassette transporter gene expression in rat liver progenitor cells. *Gut*. 2003. július 1.;52(7):1060–7.
 42. Ros JE, Libbrecht L, Geuken M, Jansen PLM, Roskams TAD. High expression of

- MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J Pathol.* 2003. augusztus;200(5):553–60.
43. Otsuka M, Matsumoto T, Morimoto R, Arioka S, Omote H, Moriyama Y. A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005. december 13.;102(50):17923–8.
 44. Stieger B, Meier Y, Meier PJ. The bile salt export pump. *Pflugers Arch.* 2007. február;453(5):611–20.
 45. Telbisz Á, Homolya L. Recent advances in the exploration of the bile salt export pump (BSEP/ABCB11) function. *Expert Opin Ther Targets.* 2016;20(4):501–14.
 46. Oude Elferink RPJ, Paulusma CC. Function and pathophysiological importance of ABCB4 (MDR3 P-glycoprotein). *Pflugers Arch.* 2007. február;453(5):601–10.
 47. Yu L, Gupta S, Xu F, Liverman ADB, Moschetta A, Mangelsdorf DJ, és mtsai. Expression of ABCG5 and ABCG8 is required for regulation of biliary cholesterol secretion. *J Biol Chem.* 2005. március 11.;280(10):8742–7.
 48. Yu L, Hammer RE, Li-Hawkins J, Von Bergmann K, Lutjohann D, Cohen JC, és mtsai. Disruption of Abcg5 and Abcg8 in mice reveals their crucial role in biliary cholesterol secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002. december 10.;99(25):16237–42.
 49. Banales JM, Prieto J, Medina JF. Cholangiocyte anion exchange and biliary bicarbonate excretion. *Köt. 12, World Journal of Gastroenterology.* WJG Press; 2006. o. 3496–511.
 50. Strazzabosco M. New insights into cholangiocyte physiology. *Köt. 27, Journal of Hepatology.* Elsevier B.V.; 1997. o. 945–52.
 51. Thomson JA. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* (80-). 1998. november 6.;282(5391):1145–7.
 52. Takahashi K, Yamanaka S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell.* 2006. augusztus 25.;126(4):663–76.
 53. Yu J, Vodyanik MA, Smuga-Otto K, Antosiewicz-Bourget J, Frane JL, Tian S, és

- mtsai. Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells. *Science* (80-). 2007. december 21.;318(5858):1917–20.
54. Takahashi K, Tanabe K, Ohnuki M, Narita M, Ichisaka T, Tomoda K, és mtsai. Induction of Pluripotent Stem Cells from Adult Human Fibroblasts by Defined Factors. *Cell*. 2007. november 30.;131(5):861–72.
55. Monaco M Lo, Merckx G, Ratajczak J, Gervois P, Hilkens P, Clegg P, és mtsai. Stem Cells for Cartilage Repair: Preclinical Studies and Insights in Translational Animal Models and Outcome Measures. *Stem Cells Int*. 2018;2018.
56. Ullah I, Subbarao RB, Rho GJ. Human mesenchymal stem cells - Current trends and future prospective. *Köt. 35, Bioscience Reports*. Portland Press Ltd; 2015.
57. Thomas ED, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, és mtsai. Bone-Marrow Transplantation. *Köt. 292, New England Journal of Medicine*. Massachusetts Medical Society ; 1975. o. 895–902.
58. Shimosato Y, Tanoshima R, Tsujimoto S ichi, Takeuchi M, Shiba N, Kobayashi T, és mtsai. Allogeneic Bone Marrow Transplantation versus Peripheral Blood Stem Cell Transplantation for Hematologic Malignancies in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Biol Blood Marrow Transplant*. 2020. január 1.;26(1):88–93.
59. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature*. 1997. február 27.;385(6619):810–3.
60. Lu J, Einhorn S, Venkatarangan L, Miller M, Mann DA, Watkins PB, és mtsai. Morphological and Functional Characterization and Assessment of iPSC-Derived Hepatocytes for In Vitro Toxicity Testing. *Toxicol Sci*. 2015. szeptember;147(1):39–54.
61. 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. *Köt. 15, Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. Taylor and Francis Ltd; 2019. o. 61–75.
62. Takebe T, Zhang RR, Koike H, Kimura M, Yoshizawa E, Enomura M, és mtsai. Generation of a vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ

- bud transplant. *Nat Protoc.* 2014;9(2):396–409.
63. Blasco MA, Serrano M, Fernandez-Capetillo O. Genomic instability in iPS: time for a break. *EMBO J.* 2011. március 16.;30(6):991–3.
 64. Hussein SMI, Elbaz J, Nagy AA. Genome damage in induced pluripotent stem cells: Assessing the mechanisms and their consequences. *BioEssays.* 2013. március 1.;35(3):152–62.
 65. Zhou W, Freed CR. Adenoviral gene delivery can reprogram human fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Stem Cells.* 2009. november;27(11):2667–74.
 66. Senís E, Mosteiro L, Wilkening S, Wiedtke E, Nowrouzi A, Afzal S, és mtsai. AAVvector-mediated in vivo reprogramming into pluripotency. *Nat Commun.* 2018. december 1.;9(1).
 67. Chen IP, Fukuda K, Fusaki N, Iida A, Hasegawa M, Lichtler A, és mtsai. Induced pluripotent stem cell reprogramming by integration-free sendai virus vectors from peripheral blood of patients with craniometaphyseal dysplasia. *Cell Reprogram.* 2013. december 1.;15(6):503–13.
 68. Grabundzija I, Wang J, Sebe A, Erdei Z, Kajdi R, Devaraj A, és mtsai. Sleeping Beauty transposon-based system for cellular reprogramming and targeted gene insertion in induced pluripotent stem cells. *Nucleic Acids Res.* 2013. február 1.;41(3):1829–47.
 69. Woltjen K, Michael IP, Mohseni P, Desai R, Mileikovsky M, Hämäläinen R, és mtsai. PiggyBac transposition reprograms fibroblasts to induced pluripotent stem cells. *Nature.* 2009. április 9.;458(7239):766–70.
 70. Warren L, Manos PD, Ahfeldt T, Loh YH, Li H, Lau F, és mtsai. Highly efficient reprogramming to pluripotency and directed differentiation of human cells with synthetic modified mRNA. *Cell Stem Cell.* 2010. november 5.;7(5):618–30.
 71. Kim D, Kim CH, Moon J II, Chung YG, Chang MY, Han BS, és mtsai. Generation of Human Induced Pluripotent Stem Cells by Direct Delivery of Reprogramming Proteins. *Köt. 4, Cell Stem Cell.* 2009. o. 472–6.
 72. Asrani SK, Devarbhavi H, Eaton J, Kamath PS. Burden of liver diseases in the world. *Köt. 70, Journal of Hepatology.* Elsevier B.V.; 2019. o. 151–71.

73. Schwartz RE, Fleming HE, Khetani SR, Bhatia SN. Pluripotent stem cell-derived hepatocyte-like cells. *Köt. 32, Biotechnology Advances*. Elsevier Inc.; 2014. o. 504–13.
74. Szijártó A, Fülöp A. Triggered liver regeneration: From experimental model to clinical implications. *Köt. 54, European Surgical Research*. S. Karger AG; 2015. o. 148–61.
75. Gold H. The proper study of mankind is man. *Köt. 12, The American Journal of Medicine*. Elsevier; 1952. o. 619–20.
76. Bracken MB. Why animal studies are often poor predictors of human reactions to exposure. *Köt. 102, Journal of the Royal Society of Medicine*. SAGE PublicationsSage UK: London, England; 2009. o. 120–2.
77. Sjogren AKM, Liljevald M, Glinghammar B, Sagemark J, Li XQ, Jonebring A, és mtsai. Critical differences in toxicity mechanisms in induced pluripotent stem cell-derived hepatocytes, hepatic cell lines and primary hepatocytes. *Arch Toxicol*. 2014. június 10.;88(7):1427–37.
78. Kanebratt KP, Andersson TB. Evaluation of HepaRG cells as an in vitro model for human drug metabolism studies. *Drug Metab Dispos*. 2008. július 1.;36(7):1444–52.
79. Castell J V., Jover R, Martínez-Jiménez CP, Gómez-Lechón MJ. Hepatocyte cell lines: Their use, scope and limitations in drug metabolism studies. *Köt. 2, Expert Opinion on Drug Metabolism and Toxicology*. 2006. o. 183–212.
80. Zhang K, Zhang L, Liu W, Ma X, Cen J, Sun Z, és mtsai. In Vitro Expansion of Primary Human Hepatocytes with Efficient Liver Repopulation Capacity. *Cell Stem Cell*. 2018. december 6.;23(6):806-819.e4.
81. LeCluyse EL, Witek RP, Andersen ME, Powers MJ. Organotypic liver culture models: Meeting current challenges in toxicity testing. *Crit Rev Toxicol*. 2012. július 15.;42(6):501–48.
82. Yamaguchi T, Matsuzaki J, Katsuda T, Saito Y, Saito H, Ochiya T. Generation of functional human hepatocytes in vitro: current status and future prospects. *Inflamm Regen*. 2019. december 2.;39(1):13.
83. Richert L, Liguori MJ, Abadie C, Heyd B, Manton G, Halkic N, és mtsai. *Gene*

- expression in human hepatocytes in suspension after isolation is similar to the liver of origin, is not affected by hepatocyte cold storage and cryopreservation, but is strongly changed after hepatocyte plating. *Drug Metab Dispos.* 2006. május 1.;34(5):870–9.
84. Heslop JA, Rowe C, Walsh J, Sison-Young R, Jenkins R, Kamalian L, és mtsai. Mechanistic evaluation of primary human hepatocyte culture using global proteomic analysis reveals a selective dedifferentiation profile. *Arch Toxicol.* 2017. január 1.;91(1):439–52.
 85. Godoy P, Widera A, Schmidt-Heck W, Campos G, Meyer C, Cadenas C, és mtsai. Gene network activity in cultivated primary hepatocytes is highly similar to diseased mammalian liver tissue. *Arch Toxicol.* 2016. október 1.;90(10):2513–29.
 86. Al-Qubaisi M, Rozita R, Yeap S-K, Omar A-R, Ali A-M, Alitheen NB. Selective cytotoxicity of goniothalamine against hepatoblastoma HepG2 cells. *Molecules.* 2011. április 6.;16(4):2944–59.
 87. Ansele JH, Smith WR, Perry CH, St. Claire RL, Brouwer KR. An In Vitro Assay to Assess Transporter-Based Cholestatic Hepatotoxicity Using Sandwich-Cultured Rat Hepatocytes. *Drug Metab Dispos.* 2010. február 1.;38(2):276–80.
 88. 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. Laconi E, szerkesztő. *PLoS One.* 2020. január 23.;15(1):e0227751.
 89. Soldatow VY, LeCluyse EL, Griffith LG, Rusyn I. In vitro models for liver toxicity testing. *Toxicol Res.* 2013. január 1.;2(1):23–39.
 90. Meseguer-Ripolles J, Khetani SR, Blanco JG, Iredale M, Hay DC. Pluripotent Stem Cell-Derived Human Tissue: Platforms to Evaluate Drug Metabolism and Safety. *AAPS J.* 2018. január 21.;20(1):20.
 91. Siller R, Greenhough S, Naumovska E, Sullivan GJ. Small-Molecule-Driven Hepatocyte Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. *Stem Cell Reports.* 2015. május 12.;4(5):939–52.
 92. Erdei Z, Schamberger A, Török G, Szabó K, Várady G, Orbán TI, és mtsai. Generation of multidrug resistant human tissues by overexpression of the ABCG2 multidrug transporter in embryonic stem cells. *PLoS One.* 2018;13(4).

93. Itskovitz-Eldor J, Schuldiner M, Karsenti D, Eden A, Yanuka O, Amit M, és mtsai. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med.* 2000;6(2):88–95.
94. Abe K, Niwa H, Iwase K, Takiguchi M, Mori M, Abé SI, és mtsai. Endoderm-specific gene expression in embryonic stem cells differentiated to embryoid bodies. *Exp Cell Res.* 1996. november 25.;229(1):27–34.
95. Zorn AM, Mason J. Gene expression in the embryonic *Xenopus* liver. *Mech Dev.* 2001. május 1.;103(1–2):153–7.
96. Wilkins BJ, Pack M. Zebrafish Models of Human Liver Development and Disease. In: *Comprehensive Physiology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2013. o. 1213–30.
97. Gordillo M, Evans T, Gouon-Evans V. Orchestrating liver development. *Köt. 142, Development (Cambridge).* Company of Biologists Ltd; 2015. o. 2094–108.
98. Fukuda-Taira S. Hepatic induction in the avian embryo: Specificity of reactive endoderm and inductive mesoderm. *J Embryol Exp Morphol.* 1981;Vol. 63:111–25.
99. Mathapati S, Siller R, Impellizzeri AAR, Lycke M, Vegheim K, Almaas R, és mtsai. Small-Molecule-Directed Hepatocyte-Like Cell Differentiation of Human Pluripotent Stem Cells. In: *Current Protocols in Stem Cell Biology.* Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc.; 2016. o. 1G.6.1-1G.6.18.
100. Hannan NR, Segeritz CP, Touboul T, Vallier L. Production of hepatocyte-like cells from human pluripotent stem cells. *Nat Protoc.* 2013;8(2):430–7.
101. Touboul T, Hannan NR, Corbineau S, Martinez A, Martinet C, Branchereau S, és mtsai. Generation of functional hepatocytes from human embryonic stem cells under chemically defined conditions that recapitulate liver development. *Hepatology.* 2010. május;51(5):1754–65.
102. Li Z, Wu J, Wang L, Han W, Yu J, Liu X, és mtsai. Generation of qualified clinical-grade functional hepatocytes from human embryonic stem cells in chemically defined conditions. *Cell Death Dis.* 2019. október 1.;10(10).
103. Sachinidis A, Albrecht W, Nell P, Cherianidou A, Hewitt NJ, Edlund K, és mtsai. Road Map for Development of Stem Cell-Based Alternative Test Methods. *Köt. 25,*

Trends in Molecular Medicine. Elsevier Ltd; 2019. o. 470–81.

104. Raju R, Chau D, Notelaers T, Myers CL, Verfaillie CM, Hu WS. In vitro pluripotent stem cell differentiation to hepatocyte ceases further maturation at an equivalent stage of e15 in mouse embryonic liver development. *Stem Cells Dev.* 2018. július 1.;27(13):910–21.
105. Baxter M, Withey S, Harrison S, Segeritz C-P, Zhang F, Atkinson-Dell R, és mtsai. Phenotypic and functional analyses show stem cell-derived hepatocyte-like cells better mimic fetal rather than adult hepatocytes. *J Hepatol.* 2015;62(3):581–9.
106. Faulkner-Jones A, Fyfe C, Cornelissen D-J, Gardner J, King J, Courtney A, és mtsai. Bioprinting of human pluripotent stem cells and their directed differentiation into hepatocyte-like cells for the generation of mini-livers in 3D. *Biofabrication.* 2015. október 21.;7(4):044102.
107. Baharvand H, Hashemi SM, Kazemi Ashtiani S, Farrokhi A. Differentiation of human embryonic stem cells into hepatocytes in 2D and 3D culture systems in vitro. *Int J Dev Biol.* 2006;50(7):645–52.
108. Miki T, Ring A, Gerlach J. Hepatic differentiation of human embryonic stem cells is promoted by three-dimensional dynamic perfusion culture conditions. *Tissue Eng Part C Methods.* 2011. május;17(5):557–68.
109. Pettinato G, Ramanathan R, Fisher RA, Mangino MJ, Zhang N, Wen X. Scalable Differentiation of Human iPSCs in a Multicellular Spheroid-based 3D Culture into Hepatocyte-like Cells through Direct Wnt/ β -catenin Pathway Inhibition. *Sci Rep.* 2016. szeptember 12.;6:32888.
110. Freyer N, Knöspel F, Strahl N, Amini L, Schrade P, Bachmann S, és mtsai. Hepatic Differentiation of Human Induced Pluripotent Stem Cells in a Perfused Three-Dimensional Multicompartment Bioreactor. *Biores Open Access.* 2016. augusztus;5(1):235–48.
111. Farzaneh Z, Pournasr B, Ebrahimi M, Aghdami N, Baharvand H. Enhanced Functions of Human Embryonic Stem Cell-derived Hepatocyte-like Cells on Three-dimensional Nanofibrillar Surfaces. *Stem Cell Rev Reports.* 2010. december 7.;6(4):601–10.
112. Takebe T, Sekine K, Enomura M, Koike H, Kimura M, Ogaeri T, és mtsai.

- Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature*. 2013. július 3.;499(7459):481–4.
113. Fickert P, Zollner G, Fuchsbichler A, Stumptner C, Pojer C, Zenz R, és mtsai. Effects of Ursodeoxycholic and Cholic Acid Feeding on Hepatocellular Transporter Expression in Mouse Liver. *Gastroenterology*. 2001. július;121(1):170–83.
 114. Fu D, Wakabayashi Y, Lippincott-Schwartz J, Arias IM. Bile acid stimulates hepatocyte polarization through a cAMP-Epac-MEK-LKB1-AMPK pathway. *Proc Natl Acad Sci*. 2011. január 25.;108(4):1403–8.
 115. Sommerfeld A, Mayer PGK, Cantore M, Häussinger D. Regulation of Plasma Membrane Localization of the Na⁺-Taurocholate Cotransporting Polypeptide (Ntcp) by Hyperosmolarity and Tauroursodeoxycholate. *J Biol Chem*. 2015. október 2.;290(40):24237–54.
 116. DeLaForest A, Nagaoka M, Si-Tayeb K, Noto FK, Konopka G, Battle MA, és mtsai. HNF4A is essential for specification of hepatic progenitors from human pluripotent stem cells. *Development*. 2011. október 1.;138(19):4143–53.
 117. Tauran Y, Poulain S, Lereau-Bernier M, Danoy M, Shinohara M, Segard BD, és mtsai. Analysis of the transcription factors and their regulatory roles during a step-by-step differentiation of induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Mol Omi*. 2019;15(6):383–98.
 118. Bonzo JA, Ferry CH, Matsubara T, Kim JH, Gonzalez FJ. Suppression of hepatocyte proliferation by hepatocyte nuclear factor 4 α in adult mice. *J Biol Chem*. 2012. március 2.;287(10):7345–56.
 119. Meehan RR, Barlow DP, Hill RE, Hogan BL, Hastie ND. Pattern of serum protein gene expression in mouse visceral yolk sac and foetal liver. *EMBO J*. 1984. augusztus 1.;3(8):1881–5.
 120. Kuhlmann WD, Peschke P. Hepatic progenitor cells, stem cells, and AFP expression in models of liver injury. *Int J Exp Pathol*. 2006. október;87(5):343–59.
 121. Cai J, Zhao Y, Liu Y, Ye F, Song Z, Qin H, és mtsai. Directed differentiation of human embryonic stem cells into functional hepatic cells. *Hepatology*. 2007. május;45(5):1229–39.

122. Ghodsizadeh A, Taei A, Totonchi M, Seifinejad A, Gourabi H, Pournasr B, és mtsai. Generation of liver disease-specific induced pluripotent stem cells along with efficient differentiation to functional hepatocyte-like cells. *Stem Cell Rev.* 2010;6(4):622–32.
123. Furuya K, Zheng YW, Sako D, Iwasaki K, Zheng DX, Ge JY, és mtsai. Enhanced hepatic differentiation in the subpopulation of human amniotic stem cells under 3D multicellular microenvironment. *Köt. 11, World Journal of Stem Cells.* Baishideng Publishing Group Co; 2019. o. 705–21.
124. Cai J. Protocol for directed differentiation of human pluripotent stem cells toward a hepatocyte fate. *StemBook.* 2014. június 10.;
125. Meier F, Freyer N, Brzezczynska J, Knöspel F, Armstrong L, Lako M, és mtsai. Hepatic differentiation of human iPSCs in different 3D models: A comparative study. *Int J Mol Med.* 2017. december;40(6):1759–71.
126. El Baz H, Demerdash Z, Kamel M, Hammam O, Samir Abdelhady D, Mahmoud S, és mtsai. Induction of Hepatic Regeneration in an Experimental Model Using Hepatocyte-Differentiated Mesenchymal Stem Cells. *Cell Reprogram.* 2020. április 3.;
127. El Baz H, Demerdash Z, Kamel M, Atta SA, Salah F, Hassan S, és mtsai. Potentials of differentiated human cord blood-derived unrestricted somatic stem cells in treatment of liver cirrhosis. *Exp Clin Transplant.* 2019. április 1.;17(2):251–8.
128. Hurrell T, Segeritz C-P, Vallier L, Lilley KS, Cromarty AD. A proteomic time course through the differentiation of human induced pluripotent stem cells into hepatocyte-like cells. *Sci Rep.* 2019;9(1):3270.
129. Abazari MF, Soleimanifar F, Enderami SE, Nasiri N, Nejati F, Mousavi SA, és mtsai. Decellularized amniotic membrane Scaffolds improve differentiation of iPSCs to functional hepatocyte-like cells. *J Cell Biochem.* 2020. február 1.;121(2):1169–81.
130. Chen Y, Soto-Gutierrez A, Navarro-Alvarez N, Rivas-Carrillo JD, Yamatsuji T, Shirakawa Y, és mtsai. Instant hepatic differentiation of human embryonic stem cells using activin A and a deleted variant of HGF. *Cell Transplant.* 2006;15(10):865–71.
131. Corbett JL, Duncan SA. iPSC-Derived Hepatocytes as a Platform for Disease Modeling and Drug Discovery. *Köt. 6, Frontiers in Medicine.* Frontiers Media S.A.;

2019. o. 265.
132. Guan Y, Xu D, Garfin PM, Ehmer U, Hurwitz M, Enns G, és mtsai. Human hepatic organoids for the analysis of human genetic diseases. *JCI insight*. 2017. szeptember 7.;2(17).
 133. Kiamehr M, Alexanova A, Viiri LE, Heiskanen L, Vihervaara T, Kauhanen D, és mtsai. hiPSC-derived hepatocytes closely mimic the lipid profile of primary hepatocytes: A future personalised cell model for studying the lipid metabolism of the liver. *J Cell Physiol*. 2019. április 1.;234(4):3744–61.
 134. Gieseck III RL, Hannan NRF, Bort R, Hanley NA, Drake RAL, Cameron GWW, és mtsai. Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Derived Hepatocytes by 3D-Culture. *Lako M, szerkesztő. PLoS One*. 2014. január 22.;9(1):e86372.
 135. Si-Tayeb K, Noto FK, Nagaoka M, Li J, Battle MA, Duris C, és mtsai. Highly efficient generation of human hepatocyte-like cells from induced pluripotent stem cells. *Hepatology*. 2010. január;51(1):297–305.
 136. Zhao D, Chen S, Cai J, Guo Y, Song Z, Che J, és mtsai. Derivation and characterization of hepatic progenitor cells from human embryonic stem cells. *PLoS One*. 2009;4(7):10.
 137. Medine CN, Lucendo-Villarin B, Zhou W, West CC, Hay DC. Robust generation of hepatocyte-like cells from human embryonic stem cell populations. *J Vis Exp*. 2011;10.
 138. Erdélyi-Belle B, Török G, Apáti Á, Sarkadi B, Schaff Z, Kiss A, és mtsai. Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *Pathol Oncol Res*. 2015. szeptember 7.;21(4):1059–70.
 139. Orbán TI, Apáti Á, Németh A, Varga N, Krizsik V, Schamberger A, és mtsai. Applying a “Double-Feature” Promoter to Identify Cardiomyocytes Differentiated from Human Embryonic Stem Cells Following Transposon-Based Gene Delivery. *Stem Cells*. 2009. május 1.;27(5):1077–87.
 140. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 1951. november;193(1):265–75.
 141. Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF. Normalization of Real-Time Quantitative

- Reverse Transcription-PCR Data: A Model-Based Variance Estimation Approach to Identify Genes Suited for Normalization, Applied to Bladder and Colon Cancer Data Sets. *Cancer Res.* 2004. augusztus 1.;64(15):5245–50.
142. Sokal RR, Michener CD. A statistical method for evaluating systematic relationships. *Univ Kansas Sci Bull.* 1958;38:1409–38.
 143. Øyvind H, David ATH, Paul DR. Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. *Palaeontol Electron.* 2001;4(1):9.
 144. Schwall RH, Robbins K, Jardieu P, Chang L, Lai C, Terrell TG. Activin induces cell death in hepatocytes in vivo and in vitro. *Hepatology.* 1993. augusztus;18(2):347–56.
 145. Nishihara T, Okahashi N, Ueda N. Activin A Induces Apoptotic Cell Death. *Biochem Biophys Res Commun.* 1993. december 15.;197(2):985–91.
 146. Pauklin S, Vallier L. Activin/Nodal signalling in stem cells. *Development.* 2015. február 15.;142(4):607–19.
 147. Lilienberg Julianna. Matrigél- és kollagén-szendvics tenyésztés hatása az embrionális őssejtekből differenciáltatott májsejtszerű sejtek polarizációjára. Eötvös Lóránd Tudományegyetem; 2016.
 148. Hoffmaster KA, Turncliff RZ, LeCluyse EL, Kim RB, Meier PJ, Brouwer KLR. P-glycoprotein Expression, Localization, and Function in Sandwich-Cultured Primary Rat and Human Hepatocytes: Relevance to the Hepatobiliary Disposition of a Model Opioid Peptide. *Pharm Res.* 2004. július;21(7):1294–302.
 149. Swift B, Brouwer KLR. Influence of seeding density and extracellular matrix on bile Acid transport and mrp4 expression in sandwich-cultured mouse hepatocytes. *Mol Pharm.* 2010. április 5.;7(2):491–500.
 150. Lang D, Radtke M, Bairlein M. Highly Variable Expression of CYP1A1 in Human Liver and Impact on Pharmacokinetics of Riociguat and Granisetron in Humans. *Chem Res Toxicol.* 2019. június 17.;32(6):1115–22.
 151. Draushuk AT, McGarrigle BP, Larsen KE, Stegeman JJ, Olson JR. Detection of CYP1A1 protein in human liver and induction by TCDD in precision-cut liver slices incubated in dynamic organ culture. *Carcinogenesis.* 1998. augusztus;19(8):1361–8.

152. Pang XY, Cheng J, Kim JH, Matsubara T, Krausz KW, Gonzalez FJ. Expression and regulation of human fetal-specific CYP3A7 in mice. *Endocrinology*. 2012. március;153(3):1453–63.
153. Betts S, Björkhem-Bergman L, Rane A, Ekström L. Expression of CYP3A4 and CYP3A7 in Human Foetal Tissues and its Correlation with Nuclear Receptors. *Basic Clin Pharmacol Toxicol*. 2015. október 1.;117(4):261–6.
154. Rendón-Huerta EP, Torres-Martínez A, Charles-Niño C, Rivas-Estilla AM, Paez A, Fortoul TI, és mtsai. Pegylated interferon- α 2b and ribavirin decrease claudin-1 and E-cadherin expression in HepG2 and Huh-7.5 cells. *Ann Hepatol*. 2013. július 1.;12(4):448–57.
155. Mee CJ, Harris HJ, Farquhar MJ, Wilson G, Reynolds G, Davis C, és mtsai. Polarization Restricts Hepatitis C Virus Entry into HepG2 Hepatoma Cells. *J Virol*. 2009. június 15.;83(12):6211–21.
156. Orbán TI, Apáti Á, Németh A, Varga N, Krizsik V, Schamberger A, és mtsai. Applying a “Double-Feature” Promoter to Identify Cardiomyocytes Differentiated from Human Embryonic Stem Cells Following Transposon-Based Gene Delivery. *Stem Cells*. 2009. május 1.;27(5):1077–87.
157. Orbán TI, Seres L, Özvegy-Laczka C, Elkind NB, Sarkadi B, Homolya L. Combined localization and real-time functional studies using a GFP-tagged ABCG2 multidrug transporter. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008. március 14.;367(3):667–73.
158. Ozvegy C, Váradi 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. december 13.;277(50):47980–90.
159. Honjo Y, Hrycyna CA, Yan QW, Medina-Pérez WY, Robey RW, van de Laar A, és mtsai. Acquired mutations in the MXR/BCRP/ABCP gene alter substrate specificity in MXR/BCRP/ABCP-overexpressing cells. *Cancer Res*. 2001. szeptember 15.;61(18):6635–9.

ADATLAP a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához*

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: Török György

MTMT-azonosító: 10035824

A doktori értekezés címe és alcíme: Májspecifikus transzporterek kifejeződésének vizsgálata humán embrionális őssejtekből differenciáltatott májsejt-szerű sejtekben

DOI-azonosító: 10.15476/ELTE.2020.071

A doktori iskola neve: Biológiai Doktori Iskola

A doktori iskolán belüli doktori program neve: Molekuláris sejt- és neurobiológia

A témavezető neve és tudományos fokozata: Dr. Homolya László, DSc.

A témavezető munkahelye: Természettudományi Kutatóközpont, Enzimológiai Intézet

II. Nyilatkozatok

1. A doktori értekezés szerzőjeként

a) hozzájárok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi kar Dékáni Hivatal Doktori, Habilitációs és Nemzetközi Ügyek Csoportjának ügyintézőjét, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

b) kérem, hogy a mellékelt kérelemben részletezett szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentés közzétételéig a doktori értekezést ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

c) kérem, hogy a nemzetbiztonsági okból minősített adatot tartalmazó doktori értekezést a minősítés (*dátum*)-ig tartó időtartama alatt ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban;

d) kérem, hogy a mű kiadására vonatkozó mellékelt kiadó szerződésre tekintettel a doktori értekezést a könyv megjelenéséig ne bocsássák nyilvánosságra az Egyetemi Könyvtárban, és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban csak a könyv bibliográfiai adatait tegyék közzé. Ha a könyv a fokozatszerzést követően egy évig nem jelenik meg, hozzájárlok, hogy a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az Egyetemi Könyvtárban és az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárlok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2020.05.20.



.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

*ELTE SZMSZ SZMR 12. sz. melléklet