

MTA doktori értekezés tézisei

**A nagy (össejt)kaland; pluripotens össejtvonalak létrehozása, jellemzése és
felhasználási lehetőségeik**

Apáti Ágota



Enzimológiai Intézet, TTK, ELKH

Budapest

2023

ÖSZEFoglalás

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

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

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

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

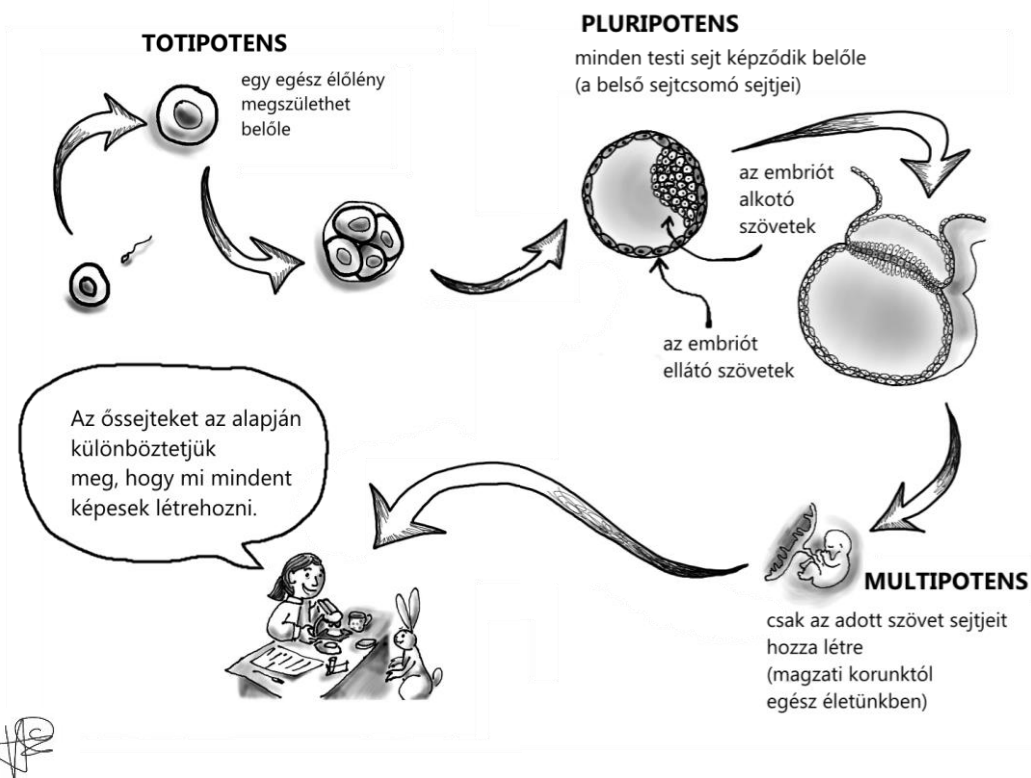
TARTALOMJEGYZÉK

ÖSZEFoglalás	2
TARTALOMJEGYZÉK	3
1. IRODALMI BEVEZETŐ	4
1.1. Az őssejtek fajtái	4
1.2. A „mindentudó” őssejt, avagy milyenek a pluripotens őssejtek	5
1.3. Az őssejtek funkcionális vizsgálatainak szereplői.....	12
2. CÉLKITŰZÉSEK	15
3. MÓDSZEREK	16
4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK.....	16
4.1. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és jellemzése	16
4. 2. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és vizsgálata	16
4.2.1. Milyen multidrog transzporterek működnek a pluripotens őssejteken?	16
4.2.2. Mire használja az őssejt a transzportereket?	18
4.2.3. Milyen az ABC transzporterek mintázata a pluripotens őssejteken illetve a belőlük differenciáltatott sejtípusokon?	20
4.2.4. Hogyan használható ez a tudás drog rezisztens szövetek tervezésében?	21
4.3. Milyen a pluripotens őssejtek kalcium szignalizációja és milyen módszerekkel érdemes ezt vizsgálni?	22
4.3.1. Kalcium szignálok humán pluripotens őssejtekben	22
4.3.2. Kalcium szignálok mérése genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével	23
4.3.3. Kalcium szignalizáció vizsgálata genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével hPSC –eredetű idegsejtekben	25
4.4. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek jellemzői és felhasználási lehetőségeik	28
4.4.1. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek immunológiai tulajdonságai ..	28
4.4.2. A Frank Ter Haar szindróma humán pluripotens őssejt-alapú modellje	29
5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA	30
7. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK.....	32
9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS.....	34
10. IRODALOMJEGYZÉK.....	35

1. IRODALMI BEVEZETŐ

1.1. Az őssejtek fajtái

Az őssejt egy nem specializálódott, korlátlan számú osztódásra és önmegújulásra képes sejt, amely aszimmetrikus osztódás révén egy önmagával megegyező és egy elkötelezettebb/érettebb utódsejtet is létre tud hozni. Mai tudásunk szerint az őssejteket fejlődési potenciáljuk alapján három nagy csoportba osztjuk; totipotens, pluripotens és multipotens őssejtekről beszélünk (1. ábra). Ezek a kategóriák természetesen mesterségesek, mert egy életen át tartó folyamatot próbálunk beszorítani három csoportba.



1. ábra Az őssejtek típusai és fejlődési potenciálja

Totipotensek a megtermékenyített petesejt és a szedercsíra sejtjei nyolcsejtes állapotig. A totipotens sejt képes az embrionális és az extraembrionális szöveteket is létrehozni. A totipotens sejteket a pre-implantációs diagnosztikai eljárások és az állattenyésztésben kivételesen értékes tenyészállatok klónozására vagy kihalófélben lévő fajok megmentésére használják.

A fejlődésben a következő állapot, amit elkülönítünk, a pluripotens állapot. Pluripotensek a hólyagsíra állapotú embrió belső sejtcsoomójában lévő sejtek, amelyekből az összes testi sejt létrejön, míg a hólyagsíra külső sejtrétegéből az extraembrionális szövetek keletkeznek. Annak a felfedezése, hogy a hólyagsíra belső sejtcsoomójából nyerhető sejtek laboratóriumi körülmények között tenyészthetők, belőlük sejtvonalak hozhatók létre [1] és, hogy ezek a

sejtvonalak genetikailag módosíthatóak és mindenféle sejttípus létrehozható belőlük *in vitro* körülmények között is, nagyban elősegítette a betegségek mechanizmusának kutatását. A technika lehetővé tette „Knockout” (KO) állatok létrehozását, amelyekben adott fehérjék *in vivo* funkciója vizsgálható és ezen keresztül, betegségmodellek kidolgozásához illetve a fejlődési vagy a regenerációs folyamatok követéséhez nyújtanak segítséget.

A következő fejlődési állapot a beágyazódás során létrejövő primitív szövetek (ektoderma, mezoderma és endoderma) megjelenéséhez köthető, ezek az ősei azoknak a szöveteknek, amelyek később a kifejlett szervezetben is megjelennek. Ezek a primitív szövetek illetve a később a különböző szövetekben megtalálható szövetre jellemző őssejtek multipotensek, ami azt jelenti, hogy az adott szövetre specifikus sejtfeleségek létrehozásáért felelősek egész életünkben. A multipotens sejteket szöveti őssejteknek is szokás nevezni, arra utalva, hogy a szervezetben a különböző szövetekben kulcsfontosságú szerepük van a szövet homeosztázisának fenntartásában, illetve a regenerációs folyamatokban. A multipotens sejteket szokás további kategóriákba is sorolni; az oligopotens őssejtek több sejtfeleséget képesek létrehozni (például a vérképző őssejt a teljes vérképzést biztosítja vagy a mezenchimális sejtekből csont, bőr és porc is keletkezhet), de ismerünk bipotens (máj progenitorok) vagy unipotens őssejteket is (az izomsejteket létrehozó ún. szatellita sejtek szaporodóképes sejtek, de csak izomsejtekké tudnak érn).

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

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

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

Amint azt már az előző alfejezetben is említettem, az egér embrionális őssejtvonalak felfedezése alapjaiban változtatta meg az őssejtekről alkotott nézeteinket. Amikor 1981-ben

kiderült, hogy ezekből az egér embrióban pluripotens állapotú sejtekből sejtvonalat lehet létrehozni, az nagy lendületet adott több kutatási területnek is. A sejt- és fejlődésbiológiai kutatások és a gyógyszerkutatás fejlődése mellett, előkészítette a talajt a humán pluripotencia vizsgálatához, ami még nagyobb reményeket és elvárásokat keltett tudományos körökben és a mindennapi élet szintjén is.

1.2.1. Mit tudunk ezekről a humán pluripotens őssejtekről?

1998-ban James Thomson és munkatársai először bizonyították, hogy az egérhez hasonlóan humán blasztocisztából is lehet pluripotens őssejtvonalat alapítani [2] és az így izolált sejtek folyamatosan osztódtak, hónapokig fenntarthatók voltak. Hamarosan arról is megjelentek közlemények, hogy a tenyésztési körülmények megváltoztatásával mindhárom csíralemez irányába spontán tudnak differenciálódni [3, 4].

A differenciációs protokollok akkoriban azon alapultak, hogy az embrionális őssejteket a dajkasejt rétegről enzimatikusan eltávolítva, megemelt szérum tartalmú, szuszpenziós médiumban tartva, embriótesteket alkotnak (EB-embryoid body), amelyekben megindul a sejtérés. Ha néhány nap múlva az embriótesteket adherens felületre teszik (általában zselatint alkalmaztak), akkor az EB-k letapadnak és a legkülönbözőbb sejtípusok fedezhetők fel a tenyészetekben.

A probléma az így létrehozott spontán differenciálódott sejtekkel az volt, hogy minden tenyészet különböző összetételű, így egy-egy sejtípust nehéz vizsgálni benne. A kívánt sejtípusok feldúsítása a spontán tenyészetekben az egyik út, amin elindultak az őssejtkutatók; 2001-ben több olyan közlemény is megjelent, amelyben a sejtterápiás szempontból fontos sejtípusok (szívizom [5], idegsejtek [6] és inzulintermelő sejtek [7]) feldúsításáról számoltak be.

Az őssejtterápiák alapja, hogy a szervezetben rosszul működő vagy hiányozó sejtípusokat az őssejtekből létrehozott egészséges sejtekkel pótoljuk. Már 2001-ben megjelent az első transzplantációs kísérletet leíró munka, amelyben ES-ből származó neurális progenitorokat ültettek be újszülött egerek agyába, ahol ezek megtapadtak és tovább differenciálódtak [8].

Hatalmas remények és éles társadalmi viták támadtak a humán ES-sejtekkel kapcsolatban, de az biztos volt, hogy a terápiák bevezetéséhez az őssejteket jobban meg kell ismerni, új és hatékony differenciációs protokollokra illetve a kívánt irányba differenciált sejtek megfelelő tisztaságát biztosító elválasztási módszerekre és az állati termékek kizárására lesz szükség. Kritériumként jelent meg a magas telomeráz és alkalikus foszfatáz aktivitás, az állapot-specifikus antigének (SSEA) kifejeződése és a teratoma képzés [2], továbbá a kulcs transzkripciós faktorok jelenléte a pluripotens őssejt sejtmagjában; az OCT3/4, a Sox2 és a

Nanog a pluripotencia fenntartásához elengedhetetlenek és egymással szoros összeköttetésben működnek [9].

1.2.2. Az indukált pluripotencia felfedezése

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

Shinya Yamanaka és Kazutoshi Takahasi 2006-ban tette közzé azt a felfedezésüket, hogy érett, szöveti sejteket genetikai módszerekkel vissza lehet programozni az embrionális őssejtekhez nagyon hasonló pluripotens őssejteké. Az először egér sejteken [10], majd egy éven belül emberi sejteken is sikerrel alkalmazott [11] módszer lényege, hogy néhány speciális gén bejuttatásával - ezek az ún. Yamanaka faktorok: Oct4, Sox2, Myc és Klf4 - az érett bőrsejtekből indukált pluripotens őssejtek (iPSC) hozhatók létre.

Az eljárás olyan hatékornak bizonyult, hogy ma már a módszer-változatok egész tárháza áll rendelkezésre, attól függően, hogy a hatékonyság, a biztonság vagy tudományos ismeretek bővítése a cél [12, 13].

A visszaprogramozáshoz gyakorlatilag bármely sejtmaggal rendelkező sejt használható, a klasszikusan használt bőrsejtektől a vér mononukleáris sejtjein át a vizeletben található epitél jellemű sejtekig [13].

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

1.2.3. A pluripotens őssejtek tenyésztése és jellemzése

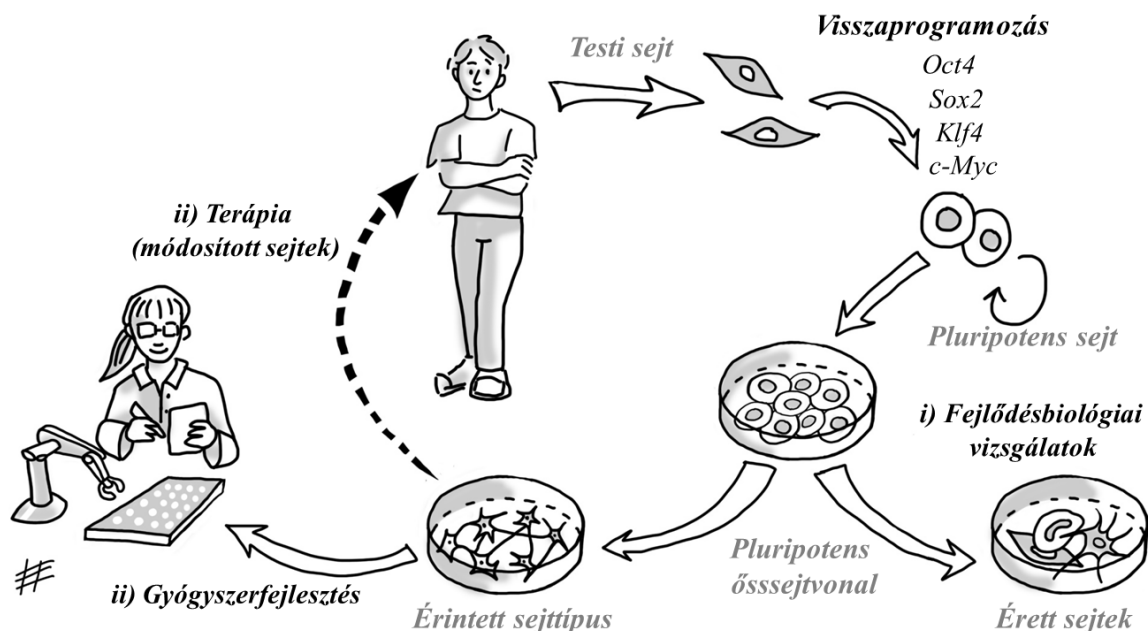
A humán pluripotens őssejteket (hPSC) eleinte, az egér pluripotens őssejtekhez hasonlóan, osztódásgátolt egér embrionális fibroblaszt sejteken (MEF) ún. dajkasejt rétegen tenyésztették és a tenyésztő médiumba borjú szérumot és fibroblaszt növekedési faktor II (bFGF) kiegészítőt használtak. Hamarosan felmerült az igény az állati termékek kiküszöbölésére, hiszen ha emberi gyógyításra akarjuk használni az őssejteket, ezzel mindenképpen törődnünk kell. A médiumok állati terméktől mentesek és kémiaiilag jobban definiált összetételűek lettek, míg az egér fibroblaszt helyett megjelentek a humán dajkasejtek [14], illetve később a

dajkasejtmentes tenyésztésre alkalmas extracelluláris mátrixok és az ehhez igazított médiumok is.

A humán pluripotens őssejtek jellemzésének szigorú szabályai vannak, amiket a sejtvonalak létrehozása és a további kísérletek során is folyamatosan be kell tartani. Ez azért fontos, mert a pluripotens állapot fenntartása nem annyira egyszerű, mint amilyennek azt az általános sejtenyésztési tapasztalattal rendelkező kutató gondolná. Ha a hPS sejteket túl ritkán szélesztjük, akkor nem szaporodnak, ha viszont túl sűrűn, akkor differenciálódni kezdenek. A részleges differenciáció azért kritikus, mert egyrészt megváltoztathatja a pluripotens sejtek tulajdonságait (gének kifejeződése, stressz tűrés, differenciációs potenciál), másrészt a különböző differenciáltatott sejttípusok hatékony létrehozásának egyik kulcsa a jó minőségű pluripotens tenyészet. Hosszú távú *in vitro* tenyésztés során a sejtek stabil genetikai állományát (pl. kariotípusát) [15] és a mycoplasma fertőzést is folyamatosan tesztelni kell. Ezeket a vizsgálatokat a dolgozatban saját példákkal bemutatom, itt azonban nem térek ki rá részletesen.

1.2.3. A humán pluripotens őssejtek felhasználási lehetőségei

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



2. ábra A hPSC-k felhasználási lehetőségei

A fejlődésbiológiai vizsgálatok felölelik a humán embrionális fejlődés olyan aspektusait is, amelyek a klasszikus állatmodellekben a fajspecifitások miatt nem vizsgálhatók. Mivel a

hPSC-k normál kariotípusú humán sejtvonalak, amelyek képesek a szervezet minden sejtípusát létrehozni, kiválóan alkalmasak a legkülönbözőbb sejtérési folyamatok vizsgálatára és az ehhez kapcsolódó jelátviteli utak feltérképezésére. Mindemellett korlátlan önmegújítási képességük révén nagy áteresztőképességű technikák használatához is megfelelő mennyiségű sejtet lehet belőlük előállítani [16].

A gyógyszerfejlesztések során szintén több lehetőség nyílik a hPSC-k felhasználására. A gyógyszerjelölt molekulák embrió-toxicitásának kiszűrésére már rutinszerűen használnak hPSC alapú rendszereket [17]. Mivel a jelátviteli utak jól vizsgálhatóak az őssejteken vagy az őssejtekből differenciáltatott sejt kultúrákon, gyógyszer támadáspontok kutatására is alkalmazhatók. A kifejlesztett molekulák különböző szervekre (szív, máj, idegsejtek stb.) gyakorolt hatásának/mellékhatásának felmérésére is egyre több őssejt alkalmazási példát találunk [18]. A betegség modellezésben az állatmodellek és a tumoros sejtvonalak mellett egyre nagyobb szerepe van a hPSC-alapú módszereknek. Ha a kiindulási sejtípus nem egészséges, hanem beteg donortól származik, akkor lehetőségünk van visszaprogramozni a beteg sejtjeit pluripotens állapotba. Így a betegségben érintett sejtípusok létrehozásával a betegség kialakulásának, biomarkerek megjelenésének követése és a lehetséges gyógyszerek tesztelése is elvégezhető [19-21].

A hPSC-k megjelenése természetesen magában hordozta a sejt alapú terápiák fejlesztési lehetőségeit is. Számos klinikai fejlesztés és kipróbálás folyik szerte a világban, de a rutinszerű alkalmazások bevezetése előtt vannak még megoldásra váró problémák [22, 23]. Ezek közül a két legfontosabb az immunológiai és a biztonsági problémák megoldása, amire vannak biztató próbálkozások [24-26]. A sikeres terápiák megszületéséhez azonban először meg kell oldani a hPSC-k hatékony és reprodukálható differenciációját a szükséges sejtípus irányába. A differenciációs módszerekről a következő fejezetben adok rövid áttekintést.

1.2.5. A humán pluripotens őssejtek differenciáltatása

Kezdetben az EB-ken keresztül zajló spontán differenciációs módszert használták különböző sejtípusok előállítására. A zselatinra letapasztott EB-k tovább differenciálódtak és megjelentek morfológiailag jól elkülöníthető sejtípusok. A kívánt sejtípust eleinte ezekből a spontán differenciálódó kultúrákból nyerték, mechanikus, enzimatikus vagy szelekciós eljárásokkal. Közben az egér embrionális fejlődés adatait felhasználva kiderült, hogy specifikus növekedési faktorok, morfogének és/vagy kismolekulák segítségével a differenciációs folyamatot irányítani tudjuk, ily módon számos sejtípust szelektíven elő lehet állítani. Az így kifejlesztett ún. irányított differenciációs protokollok tipikusan több lépésből állnak, melyek az embrionális fejlődés állapotait követik a megfelelő jelátviteli útvonalak

aktiválása vagy épp gátlása révén. A megfelelően differenciált sejteket az adott sejtípus *in vivo* jellemző markereinek kifejeződése és a sejtfunkcióinak megjelenése alapján választjuk el és vizsgáljuk [16]. Az irányított differenciációs protokollok eleinte kétdimenziós kultúrákban valósultak meg, ami a gyógyszeresztelési felhasználásnak jól megfeleltek. Az így létrehozott differenciált sejtek érettsége azonban még hosszabb idő alatt sem érte el az embrionális fejlődés késői szakaszának megfelelő állapotot. A technológia folyamatos fejlődésével megjelentek a háromdimenziós kultúrák [27, 28]. A térbeli elrendeződésnek és a különböző sejtípusok egymásra való hatásának eredményeként ezek már megközelítik a születés körüli sejtérési állapotot [29]. A legújabb fejlesztési irány ezen a téren, hogy ezeket a differenciált sejteket olyan mikrofluidikai eszközökre ún. chip-ekre ültetik, ahol a mikroszkópos technikák jobban alkalmazhatóak és a kezelések hatása is jobban mérhető [30].

Mára szinte minden sejtípusra találunk többé-kevésbé működő differenciációs protokollokat az irodalomban. Laboratóriumunkban elsősorban mezenchimális őssejtek, szívizomsejtek és neurális sejtek létrehozását valósítottuk meg, pluripotens őssejtekből kiindulva. A mezenchimális őssejtek multipotens sejtek, amelyek képesek a kanonikus mezoderális irányokba, így porc-, csont-, és zsír irányba differenciálódni [31], valamint gyulladásgátló, immunmoduláns tulajdonságokkal rendelkeznek. Ezek a tulajdonságok vonzó célponttá teszik őket terápiás felhasználáshoz. Az először azonosított és jellemzett humán MSC-eket csontvelőből izolálták [32] Azóta számos szövettípusból sikerült izolálni hasonló sejteket, a terápiás megközelítésekhez elsősorban csontvelő, zsír [33] és köldökzsinór [34] eredetű MSC-eket használnak. Amellett, hogy könnyen elérhetőek, laboratóriumi körülmények között korlátozott mértékben szaporíthatók is és stabil genommal rendelkeznek. Így az MSC-k biztonságos sejtforrásként szolgálhatnak autoimmun, gyulladássos, és degeneratív betegségek kezelésében. Habár jelenleg elsősorban felnőtt szövetekből származó MSC-eket használnak kutatásra, fejlesztésre és terápiára [35], a különböző donorokból, különböző helyről és különböző szeparálási eljárással létrehozott MSC kultúrák nagyon különbözőek fenotípusukat és funkcionális tulajdonságaikat tekintve. Ezért az MSC-k humán pluripotens őssejtekből történő előállítását kézenfekvőnek tűnt és az évek alatt számos ilyen protokoll látott napvilágot [36, 37].

Humán szívizomsejtekre nemcsak a számos és súlyos szívbetegség gyógyításához, hanem a gyógyszerek szívtoxicitás vizsgálatához is nagy szükség lenne. A hPSC eredetű szívizomsejtek mind expressziós mintázatukat, mind funkciójukat tekintve a magzati, éretlen fenotípust mutatják [38]. Ennek ellenére a gyógyszeresztelésre sikeresen alkalmazták [39] és a benne rejlő lehetőségeket egyre szélesebb körben kihasználják [40]. Számos eredmény

jelent meg kardiovaszkuláris betegségek modellezésére, elsősorban a monogénes betegségek esetében, és a gyógyszerek kardiotoxicitásának vizsgálatáról is [41, 42].

A központi idegrendszer betegségeinek vizsgálata az egyik legnehezebb feladat; a legkomplexebb szervünk megértéséhez is új megközelítést hozott a pluripotens őssejtek felfedezése. Igaz ugyan, hogy sem az agy, sem az egyes területek bonyolult szerkezetét nem tudjuk még laboratóriumi körülmények között modellezni, de a kutatók kitartó munkájának eredményeképpen képesek vagyunk különböző idegsejttípusokat, vagy az organoid technikát felhasználva több sejttípust egyszerre tartalmazó, önszerveződő ún. mini agyat létrehozni [27]. A betegség kialakulását, az ebben szerepet játszó jelpályákat illetve a lehetséges kezeléseket vizsgálhatjuk az ilyen hPSC alapú idegi betegségmodellek segítségével [43, 44]. Terápiás szempontból a különböző progenitor populációk kaptak nagy szerepet. A terület legnagyobb sikere eddig, a Parkinson-kór gyógyítására kidolgozott dopaminerg progenitor készítmények létrehozása, amelyek közül több a klinikai kipróbálás engedélyezéséig is eljutott [45].

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

1.2.6. A humán pluripotens őssejt alapú betegség modellezés

Ha a pluripotens őssejteket nem egészséges donor sejtjeiből hozzuk létre, akkor lehetőség nyílik arra, hogy az őssejtekből a betegségben érintett sejttípusokat előállítva vizsgáljuk a betegség kialakulását (biomarkereket és lehetséges gyógyszer támadáspontokat keresve), sejtszintű elváltozásokat (celluláris fenotípusokat) határozzunk meg, és ezeket gyógyszeres vagy más módon (pl. génterápia) javítsuk [46-49]. Kontrollként az egészséges családtagok és kor/nem szerint illesztett donorok mintái váltak elfogadottá [50]. Áttörést hozott a területen a genomszerkesztési módszerek megjelenése, amely lehetővé tette, hogy irányított mutációkkal ún. izogenikus vonalak legyenek vizsgálhatók; az adott betegre jellemző mutációt ki lehet javítani a hPSC vonalban vagy egy egészséges hPSC vonalban létrehozható a kérdéses mutáció [51]. Így az érdeklődésünk homlokterében álló gén hatása azonos genetikai háttérű sejtekben vizsgálható, ami nagyban segíti a reprodukálhatóságot, csökkenti a ráfordított kísérleti munkát és hatékony módszert ad a betegség kialakulásának és kezelésének felderítéséhez. Mindemellett, az összetett háttérű betegségek (mint például a pszichiátriai kórképek) vizsgálata még manapság is nagy kihívás. A GWAS vizsgálatok alapján szóba

jöhethő betegségokozó gének száma nagy, hozzájárulásuk a betegség kialakulásához nem tisztázott és a környezeti tényezők hatását sem ismerjük. Ezen a területen az *in vitro* adatok folyamatos gyűjtése és értelmezése vezethet a meghatározó jelpályák/mechanizmusok megismeréséhez, ami a jövőben a hatékonyabb terápiák fejlesztéséhez vezethet. A következő alfejezetben egy olyan betegséget említek röviden, amelynek vizsgálatára a laboratóriumunkban pluripotens őssejt alapú modellrendszert hoztunk létre, és amely ebben az értekezésben bemutatásra is kerül.

1.2.7. A Frank Ter Haar szindróma

A Frank Ter Haar szindróma (FTHS) súlyos fejlődési rendellenesség, komplex fenotipikus tünetekkel, mint csontdeformitások, szívfejlődési rendellenességek, korai megjelenésű glaukóma, csökkent zsírszövet és meddőség [52]. Családvizsgálatok kimutatták, hogy a FTHS autoszomális-recesszív öröklődési módot mutat és az *SH3PXD2b* gén mindkét alléljában mutációk vannak jelen a betegségben érintett egyéneknél [53]. A *SH3PXD2b* gén a TKS4 vázfehérjét kódolja, ami a jelátviteli utak összekapcsolójaként (hub) működik. A TKS4 részt vesz az EGF-jelátvitelben, szerepet játszik a podoszómaképzésben, és így a rák invázióban is részt vehet. Bár a TKS4 fiziológiai szerepének számos aspektusát már feltárták, a TKS4 szerepe az emberi embrionális fejlődésben és a Frank Ter Haar szindróma kialakulásában még ismeretlen. A TKS4-hiányos egerek (TKS4-KO) súlyos, többszervi fenotípussal születnek, hasonlóan az FTHS emberben jelentkező tüneteivel [54]. Figyelemre méltó, hogy az FTHS súlyosan befolyásolja a csontváz csont- és zsírszövet-összetételét, amelyek mindegyike mezenchimális őssejtekből (MSC) származik, ami arra utal, hogy az érintett egyének fejlődése során az MSC differenciációja zavart szenved. A betegség vizsgálatára nem álltak rendelkezésre humán sejt vonalak, a *SH3PXD2b* KO sejt vonalak létrehozása és mezenchimális irányú differenciációjának vizsgálata ezt a hiányt pótolná.

1.3. Az őssejtek funkcionális vizsgálatainak szereplői

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

1.3.1. Az ABC transzporterek

Az ATP kötő kazettát (ATP Binding Cassette) tartalmazó fehérjék az élővilág egyik legnagyobb fehérjecsaldja. Emberben 48 gént írtak le, szekvenciális és szerkezeti rokonság

alján 7 alcsaládba soroljuk őket, ABCA-tól ABCG-ig [55]. Kiemelkednek a családból a multidrog rezisztencia ABC (MDR-ABC) transzporterek, amelyek számos hidrofób és amfipatikus molekulát képesek eltávolítani a sejtjeinkből, amihez az ATP bontás energiáját használják. Elsődleges szerepük az olyan szöveti határok védelme, mint a bél, a tüdő, a méhlepény, a vér-agy és a vér-here gát, de részt vesznek a máj méregtelenítő funkciójában és a rákterápiák elleni gyógyszer-rezisztencia kialakulásában is. Az ABC transzporterek széles és átfedő szubsztrát felismerése hatékony védelmet biztosít a sejtek és szövetek számára a károsító faktorokkal szemben. A xenobiotikum/gyógyszer-rezisztencia, azaz a "kemoimmunitás" három legfontosabb MDR-ABC transzportere a szervezetünkben; az ABCB1, ABCC1 és ABCG2 fehérje [56]. Érdeklődésünk fókuszába azért került az ABCG2, mivel erről a transzporterről leírták, hogy szerepe van a szöveti őssejtek védelmében is [57]. Az ABCG2 egy fél-transzporter, a sejtekben homodimer formájában látja el a funkcióját, ami az endo- és a xenobiotikumok eltávolítása a sejtekből, beleértve a porfirin-anyagcsere toxikus vegyületeit és a húgysavat is [58, 59]. Érdekes módon egér génkiütéses munkák alapján és funkcionális ABCG2 fehérje nélkül élő emberek (Junior negatív vércsoport [60, 61]) vizsgálatából tudjuk, hogy ennek a fehérjének a hiánya nem közvetlenül életet fenyegető hatású, de kedvezőtlen környezeti hatások esetében fontos szerepe van a toxinok eltávolításában vagy a köszvény kialakulásában. Az őssejtek életfunkcióinak megértéséhez és így a hatékony terápia tervezéséhez elengedhetetlen, hogy az ABC transzporterek szerepét jobban megismerjük.

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

A kalciumion (Ca^{2+}), mint minden sejtben jelenlévő másodlagos hírvivő, nélkülözhetetlen szerepet játszik az alapvető élettani folyamatokban, mint a sejtosztódás, a sejtérés és a sejthalál. Annak a vizsgálata, hogy a sejtben belüli Ca^{2+} -koncentráció emelkedése hogyan szabályozhat ennyi folyamatot nagyon érdekes kérdés és több lehetőség adódik is a kísérletek kivitelezésére.

A kalcium jelátviteli utak vizsgálatára jelenleg legszélesebb körben a fluoreszcens indikátorokat képalkotó módszerekkel kombináló technikák terjedtek el, amelyek a fiziológiás sejtfunkciók minimális zavarásával teszik lehetővé a méréseket.

A kismolekulás, sejt permeábilis, szintetikus kalcium indikátorok alkalmazása áttörést hozott a kalcium jelátvitel vizsgálatában [62-64], széles körben használják ma is *in vitro/ ex vivo* kalcium jelátviteli vizsgálatokban. Alkalmazásuknak azonban számos hátránya is van; a sejtek festékekkel való töltése speciális körülményeket igényel és sok esetben a sejtmembránon átjutó, nem fluoreszcens származék fluoreszcens kalcium indikátor festékké alakulása a

sejtben toxikus metabolitokat eredményez. Mivel ezek a festékek kalcium pufferként is viselkednek, az intracelluláris festék felhalmozódás jelentősen megváltoztathatja a jelátvitelt. A töltési eljárás reprodukálhatósága és a festék egyenetlen eloszlása a sejtek között és/vagy a sejten belül komoly problémákat okozhat. Ezenkívül a festék kioltódása és/vagy fotoelhalványodása előfordulhat hosszabb mérések során [65, 66]. Ezeknek a festékeknek az *in vivo* alkalmazása is erősen korlátozott. A legjobban jellemzett, legszélesebb körben és legsikeresebben alkalmazott kalciumindikátorok a Fluo-3 és Fluo-4 festékek [67, 68]. Méréseink során gyakran mi is a Fluo-4 festéket használtuk.

A genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék a kalcium érzékeny festékek alternatívájaként szolgálnak a jelátviteli folyamatok vizsgálatában. Fejlesztésük különböző optikai tulajdonságokkal rendelkező indikátorok sorát eredményezte [69, 70]. A szövetspecifikus promóterek használatával a kiválasztott szövetekben, míg a szelektíven, egy adott sejtorganellumba való irányítással adott intracelluláris kompartmentekben vált lehetővé a kalcium szignálok tanulmányozása [71-74]. Körültekintően megválasztott expressziós körülmények között a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék minimális hatást gyakorolnak a sejt működésére, *in vivo* is használhatók, ezért hosszú távú vizsgálatokra is alkalmasak [75], bár a kalcium-pufferelés és jelátvitel megváltozása továbbra is előfordulhat [76, 77]. Hogy a genetikailag módosított kalciumindikátor fehérjék alkalmazhatóságát megismerjük a pluripotens őssejtben, differenciáció közben és differenciálódott formáikon, munkáinkban többféle konstrukcióban hasonlítottuk össze a genetikailag tervezett kalcium indikátorokat és a klasszikus fluoreszcens kalcium indikátorokat.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Az értekezésben az alábbi célkitűzésekhez kapcsolódó munkáinkról számolok be részletesebben:

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

II. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és funkcionális vizsgálata

1. Feltérképezni, hogy milyen multidrog transzporterek működnek a pluripotens őssejteken.
(Apáti et al. BBA 2008 és Sarkadi et al. Stem Cells. 2010)
2. Vizsgálni, hogy, hogyan változik a multidrog transzporterek kifejeződése a szöveti differenciáció kezdetén.
(Erdei et al. Cytometry B Clin Cytom. 2014)
3. Milyen stressz körülmények között nyújtanak védelmet az ABC transzporterek?
(Erdei et al. Eur Biophys J. 2013)
4. Használható-e ez a tudás drog rezisztens szövetek tervezésében?
(Erdei et al. PLoS One. 2018)
5. Felderíteni, hogy, milyen a pluripotens őssejtek kalcium szignalizációja és milyen módszerekkel érdemes ezt vizsgálni?
(Apáti et al. Mol Cell Endocrinol. 2012 és Apáti et al. Cell Signal. 2013)
6. A pluripotens őssejt-eredetű neurális sejtek kalcium jeleinek vizsgálata.
(Vőfély et al. Mol Cell Neurosci. 2018)

III. Pluripotens őssejtek alkalmazása

1. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek jellemzőinek és felhasználási lehetőségeinek vizsgálata.
(Varga et al. BBRC 2011)
2. Pluripotens őssejt alapú betegségmodell létrehozása.
(László et al. Int J Mol Sci. 2022)

3. MÓDSZEREK

Értekezésem célja az őssejtkutatással kapcsolatos eredményeim bemutatása, az alkalmazott módszereket a dolgozatban összefoglalom, itt csak vázlatosan említem meg.

A humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és fenntartása speciális tenyésztési, génbeviteli, klónozási és fenotípus jellemzési technikákat igényelnek [78]. Humán pluripotens őssejtvonalak differenciáltatása során az embriótest létrehozásán alapuló spontán differenciációs módszeren kívül a mezenchimális őssejteket saját fejlesztésű módszerrel [79, 80], míg a szívizom és a neurális tenyészeteket már leírt protokollok optimalizálásával valósítottuk meg [81]. Humán pluripotens őssejtek és differenciáltatott származékaik funkcionális jellemzése során az ABCG2-t kifejező sejtek Hoechst 33342 felvételét és az invadopodia vizsgálatot végeztünk. A kalcium szignalizáció vizsgálatáról pedig azt a metodikai cikket említem, amelyben lépésről-lépésre bemutatjuk a vizsgálati és értékelési módszereket [120].

4. EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉSÜK

4.1. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása és jellemzése

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

A laboratóriumunkban több vonalat tartunk fenn, hoztunk létre és használunk a különböző kísérleteink során. Új, humán pluripotens őssejtvonalakat rutinszerűen kétféle módon hozunk létre a laboratóriumunkban; (i) a meglévő vonalak genetikai módosításával (i/a) különböző fehérjék túltermelése [82-86] vagy (i/b) mutációk bevitele/kijavítása révén [87, 88], (ii) illetve szöveti sejtek visszaprogramozásával (általában vérsejtekből Sendai vírus és a négy Yamanaka faktor segítségével) [89-92]. A létrehozott őssejtvonalak részletes jellemzését bemutató rész megtalálható a dolgozatban. A kísérleteinket szigorúan ellenőrzött, pluripotens állapotú sejtekből kiindulva valósítottuk meg.

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

Amikor 2006-ban a szükséges engedélyek beszerzése és a humán embrionális sejtek tenyésztésére alkalmas laboratórium kialakítása után végre mi is elkezdhattük a munkát ezekkel a végtelenül érdekes sejtekkel, az első kérdéseink a működésükre vonatkoztak.

4.2.1. Milyen multidrogtanszporterek működnek a pluripotens őssejteken?

(vonatkozó fontosabb közlemény: Apáti A. et al. BBA 2008. és Sarkadi et al. Stem Cells. 2010)

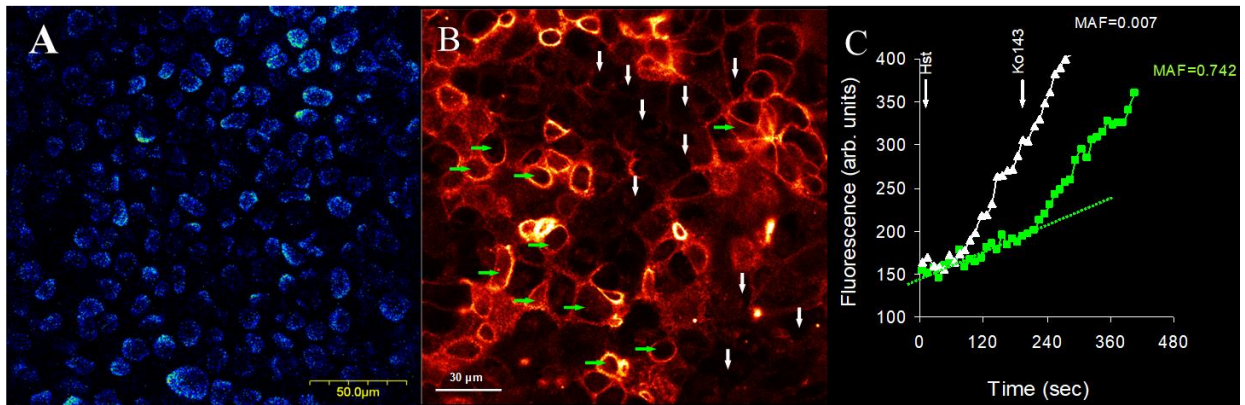
A magzat az anyaméhben nagyon sok külső károsító tényezővel szemben védett, de úgy gondoltuk, hogy a pluripotens őssejteknek saját védelemre is szükségük lehet. Az első kérdés

az volt, hogy a multidrog transzporterek közül melyek fejeződnek ki és működnek a humán embrionális őssejteken.

Két hESC vonalon, a HUES9 és HUES1 vizsgáltuk a három alap-transzporter, az ABCB1, ABCC1 és ABCG2 mRNS szintű kifejeződését. Azt tapasztaltuk, hogy a differenciálatlan őssejteken magas, míg a differenciáltotott sejteken drasztikusan csökkent ABCG2 mRNS szint mérhető. Az ABCB1 kifejeződése mind a differenciálatlan, mind a differenciált sejteken elenyésző volt. Az ABCC1 esetében pedig azt kaptuk, hogy mind a differenciálatlan, mind a differenciált őssejt eredetű mintákban magas volt az mRNS szint. A következő lépés a fehérje kifejeződés vizsgálata volt, amit az ABC transzporterek elleni specifikus ellenanyagokkal (5D3- ABCG2, MRK16- ABCB1 és R1- ABCC1) áramlási citometria segítségével végeztünk. Méréseink azt mutatták, hogy az őssejtek kifejezik az hESC-kre jellemző felszíni markereket (SSEA4 és PODXL), míg az ABCG2-re a sejtek 40-60%-a bizonyult pozitívnak. Sem az ABCB1, sem az ABCC1 fehérje jelenlétét nem sikerült kimutatni ezzel a módszerrel, ami az ABCB1 esetében nem volt meglepő, mert az mRNS szint is igen alacsony volt. Az ABCC1 esetében azonban a magas mRNS expresszió ellenére nem láttunk annak megfelelő fehérjét, amit okozhat az, hogy néhány sejtben nagyon magas az ABCC1 expresszió, ami eltolja az átlag mRNS expresszióját, vagy ami valószínűbb, hogy az ABCC1 mRNS poszttranszkripció vagy negatív transláció szabályozás alatt áll a hES sejteken.

Az eredményeink azt sugallták, hogy a pluripotens őssejteken az ABCG2 fejeződik ki a fő MDR transzporterek közül, ezért konfokális mikroszkóppal is megerősítettük, hogy az őssejteken az ABCG2 kifejeződik és a plazmamembrán helyezkedik el (3.B ábra).

Ezután kíváncsiak voltunk, hogy vajon funkcióképes-e a fehérje? Az ABCG2 funkcióját úgy lehet vizsgálni, hogy jelzett szubsztrátot (jelen esetben Hoechst 33342 (Hst) fluoreszcens magfesték) adunk a sejtekhez, amit a működőképes ABCG2 kipumpál a sejtekből. Az ABCG2 szelektív gátlószerét adva a rendszerhez (Ko143) a kipumpálás lassul vagy teljesen meg is szűnik. A kísérletet elvégezve, a fluoreszcencia intenzitást időben ábrázolni tudjuk és kiszámolható a multidrog rezisztencia aktivitás faktor (MAF) is. Mivel tudtuk, hogy az őssejteknek csak kb. a fele fejezi ki az ABCG2-t, a transzport mérést követően az ABCG2-t *in situ* jelöltük és külön értékeltük az 5D3 ellenanyaggal festődő ABCG2 pozitív és negatív sejteket. Ahogy az a 3. ábrán is látszik, az ABCG2-t kifejező sejteken a Hst fluoreszcencia intenzitása lassabban nő, mint a negatív sejteken, azonban a szelektív gátlószer (Ko143) adása után az ABCG2-t kifejező sejteken is megnő a festék felvétel sebessége, megközelítve a negatív sejteken mérhető értéket.



3. ábra. Az ABCG2 transzporter funkcionális elemzése differenciálatlan hES sejtekben. A Hst festék sejtmagban történő felhalmozódását élő HUES9 sejtekben konfokális mikroszkóppal követtük, majd kb. 2 perccel a Hst hozzáadása után, 1 μ M Ko143 hozzáadásával gátoltuk az ABCG2 működését; (A) Hst felvétel végén kékre festődött sejtmagok láthatók. (B) A Hst felvétel mérése után ugyanazt az őssejtsomót festettük 5D3 antitesttel ABCG2-re. A zöld nyilak a magas ABCG2 expresszióval rendelkező sejteket jelzik, míg a fehér nyilak azokat a sejteket mutatják, amelyekben nincs ABCG2 expresszió. (C) A Hst festék magi felhalmozódásának kinetikája; A zöld görbét az ABCG2-t expresszáló sejtek adataiból számítottuk ki (zöld nyilak). A fehér görbét olyan sejtek adataiból számítottuk ki, amelyek nem fejezik ki az ABCG2-t (fehér nyíl).

Ezekkel a kísérlettel nemcsak azt bizonyítottuk, hogy a HUES9 sejtekben kifejeződik az ABCG2 és a plazmamembránban helyezkedik el, de azt is, hogy funkcióképes. Az ABCB1 és ABCC1 esetében is végeztünk funkcionális kísérleteket, és arra következtettünk, hogy az expressziós adatainkkal összhangban ez a két fehérje nem expresszálódik számottevően az őssejteken. Megmutattuk további rendelkezésünkre álló embrionális őssejtvonalakon is az ABCG2 kifejeződését (BG01V és HUES4) és rámutattunk, hogy a nem egér dajkasejten, hanem extracelluláris mátrixon (Matrigel) tenyésztett sejtek esetében az ABCG2-t expresszáló sejtek száma és az expresszió mértéke is csökkenhet.

Később egy összefoglaló közleményben áttekintettük az irodalmi adatokat [57]; mRNS szinten a legtöbb csoport kimutatta az ABCG2-t humán pluripotens őssejtekben, míg fehérjeszinten csak több-kevesebb sikerrel tudták kimutatni. Az eltérő eredményeket elsősorban a sejtvonalak eltérő tulajdonságai, a különböző tenyésztési körülmények és a jelölési technikák változatossága okozhatja. A következő fejezetben arra keresünk választ, hogy valójában nyújtanak-e védelmet az őssejteknek?

4.2.2. Mire használja az őssejt a transzportereket?

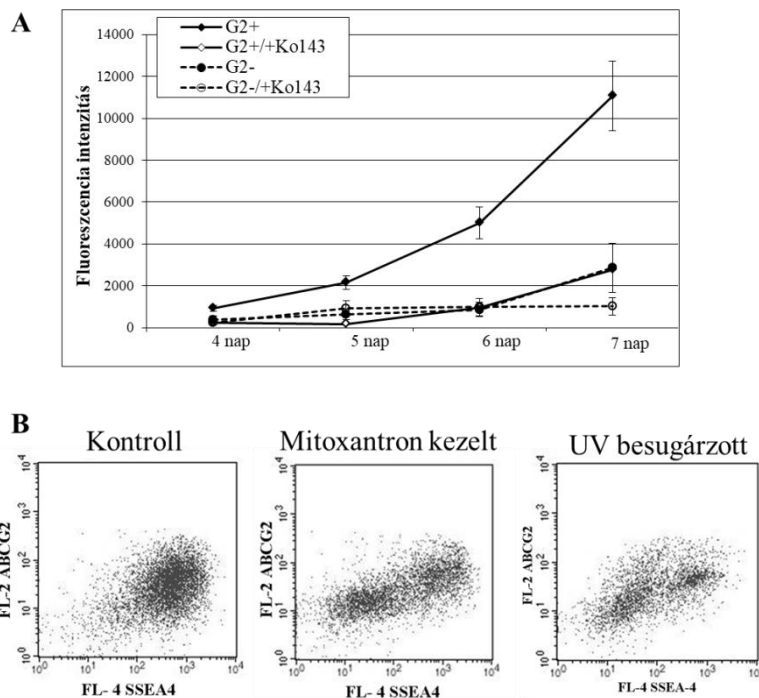
(vonatkozó fontosabb közlemény: Erdei et al. Eur Biophys J. 2013)

Az ABCG2 kifejeződése nem nélkülözhetetlen az élethez (a Junior negatív vércsoportba az ABCG2 hiányos embereket soroljuk), azonban kiderült, hogy a knock-out egerek

érzékenyebbek a xenobiotikumokra, és csökkent a hemopoietikus őssejtjeik mennyisége is. A kísérletekben az ABCG2 populációs szintű heterogenitásnak a szerepét és funkcióját vizsgáltuk.

Ha a hPSC tenyészeteket sejtszorterral szétválogattuk ABCG2 pozitív (ABCG2+) és negatív (ABCG2-) populációkra, és megmértük az Oct4 és a Nanog pluripotencia markerek kifejeződését, azt találtu hogy nincs szignifikáns különbség a differenciációs állapotban, mindkét populáció pluripotens.

Ha a szétválogatott ABCG2 pozitív és negatív sejteket tovább tenyésztettük, 7 nap múlva a kiindulási sejtpopulációnak megfelelő arányt kaptuk vissza. Ami azt mutatja, hogy a tenyészetben az ABCG2-t expresszáló sejtek aránya nem változik, azaz a sejtvonaltól és a tenyésztési körülményektől függően kialakul egy dinamikus egyensúly. Ha az ABCG2-nek a stressz elleni védekezésben van szerepe, akkor ez populációs szinten egy nagyon hatékony megoldás. Mivel a transzporterek működése energiát fogyaszt és a stressz faktorok nincsenek folyamatosan jelen, nem kell a teljes populációt védeni, viszont a stressz körülmények között mindig lesz túlélő populáció. Ezt az elképzelést látszik alátámasztani a következő kísérletsorozat (4. ábra). A hPSC tenyészetet sejtszorterral szétválogatva azt tapasztaltuk, hogy aaz ABCG2 pozitív sejtek gyorsabban kezdtek el szaporodni, mint a negatív sejteket tartalmazó populációk. Ha a tenyészeteket a sejtszortolás után az ABCG2 szelektív gátlószerét (Ko143) is tartalmazó médiumban tenyésztettük, akkor a sejtek száma nem nőtt (4.A ábra). Ez azt mutatja, hogy az ABCG2-nek szerepe van a sejtszortolás során fellépő stressz hatásokkal szemben.



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

Hogy ezt a kérdést jobban körüljárjuk, megvizsgáltuk, hogy ez a rákos sejtekhez és túltermeltetési sejtvonalakhoz viszonyítva alacsony endogén ABCG2 megvédi-e az őssejteket különböző stresszek ellen. A kontroll sejtekhez képest a mitoxantron (MX) kezelés és az UV besugárzás két különböző populációt eredményezett (4.B ábra); egy, az ABCG2 és SSEA4 együttes sejtfelszíni expresszióját mutatót (pluripotens állapot), és egy, csökkent SSEA4 és ABCG2 pozitivitásút (részlegesen differenciált állapot). Mind az MX-kezelésben, mind az UV-fény expozícióban a specifikus ABCG2 inhibitor Ko143 hozzáadása a sejtek teljes kipusztulását eredményezte.

Az SSEA4/ABCG2 kettős pozitív sejtpopulációk, amelyek nagy valószínűséggel azokat pluripotens sejteket tartalmazzák, amelyek olyan szinten fejezik ki az ABCG2-t, amely elegendő az MX vagy az UV besugárzás elleni védelemhez. A kettős negatív populáció nagy valószínűséggel az ABCG2 negatív őssejtek utódait képviseli. Ezek a sejtek differenciálódni kezdtek (amit az SSEA4 marker elvesztése is mutat), ami az őssejtek általános válasza különböző stresszhelyzetekre. A differenciálódott sejtek más mechanizmusokat használva kerülnek ki a toxikus hatásokat (például más ABC transzporterek kifejezésével, amint azt később vizsgáltuk is, lásd 4.2.3.). Eredményeink arra utalnak, hogy az ABCG2 expresszió dinamikus egyensúlya populációs szinten előnyt jelent, mert a sejtek gyorsan és hatékonyan reagálhatnak a környezet változásaira. Egy ilyen aktívan fenntartott heterogenitás evolúciós szempontból is kedvező lehet a speciális sejtípusok, köztük a pluripotens őssejtek védelmében.

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

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

A multidrog ABC transzporterek széleskörű szöveti eloszlásúak és az adott szövetre specifikus „ujjlenyomatot” mutatnak, amely megfelel az adott szövettípus speciális metabolikus igényeinek, valamint biztosítja a stressz és a drogok elleni védelmet.

Ebben a kísérletsorozatban egy ABC fehérjékre gyártott mRNS szintek meghatározására gyártott array-t használva megmutattuk, hogy az ABC transzporterek eloszlása sejtípus

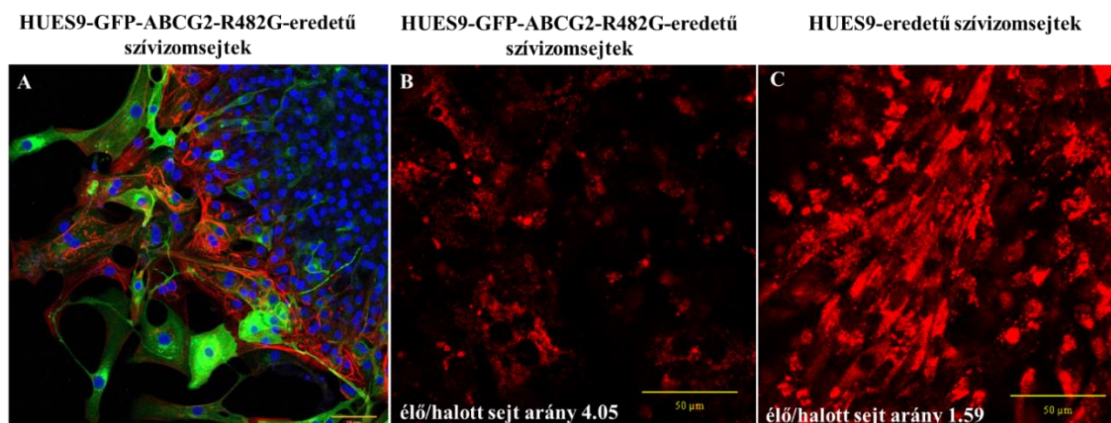
specifikus és jellemző az ES sejtekből differenciáltatott sejtípusok esetében is. Fehérjeszintű vizsgálataink is megerősítették, az mRNA szintű megfigyeléseinket. Ezek a vizsgálatok fontos információkat nyújtottak az ABC fehérjék expressziós mintázatának felderítésében a humán pluripotens emberi őssejtekre és azokból differenciáltható sejtípusokra vonatkozóan. További vizsgálatokra van azonban szükség a szövetek és szervek közötti eloszlás (ujjlenyomat) megállapításához, valamint a kulcsfontosságú humán ABC transzporterek sejtben betöltött funkcióinak megértéséhez. A pluripotens őssejtekből létrehozható háromdimenziós rendszerek alkalmazása tovább segítheti ezt a munkát, mert elősegíti a sejtek polarizációját és ezzel a transzporterek megfelelő pozícióba való jutását, illetve a sejt-sejt közötti kapcsolatok létrejöttét, amelyektől a transzporterek funkciója is nagyban függ [93].

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

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

A következő kérdésünk az volt, hogy a stabil ABCG2 expresszió lehetővé teszi-e drog rezisztens humán pluripotens őssejtek és őssejtből származó szövetek létrehozását.

Azt találtuk, hogy a GFP-ABCG2 variánsok túltermelése nem változtatott az őssejtek pluripotens állapotán, viszont a funkcióképes változatok (GFP-ABCG2wt és GFP-ABCG2-R482G variáns) megemelte a transzport aktivitást (DCV transzport mérése esetén) és védelmet biztosított a MX citotoxikus hatásával szemben. Mivel a fiziológiás humán szívizomsejtekben az ABCG2 transzporter gyakorlatilag hiányzik [94, 95], megvizsgáltuk, hogy ABCG2-R482G variánst kifejező őssejtekből differenciáltatott szívizomsejtek ellenállóbbak-e a Doxorubicin kezelésnek. A GFP-ABCG2-R482G-t túltermelő hESC-klónból dobogó szívizomtelepeket izoláltunk (5. A ábra), majd vizsgáltuk a túltermelt GFP-ABCG2-R482G potenciális védőhatását a doxorubicin (DOX) ellen. Azt találtuk, hogy a kiindulási HUES9 sejtekben nagyobb volt a sejthalál és a DOX felhalmozódás is (a DOX fluoreszcens, így a sejtekben jól kimutatható), mint az ABCG2-R482G-t kifejező párjaikban (5.B és C ábra).



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

Ezek az eredmények segíthetnek a toxikus anyagokkal szemben védett génmódosított szívsejtek létrehozásában.

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

A humán pluripotens őssejtek új lehetőséget jelentenek a jelátvitel utak feltárásában, a fiziológias sejtműködés és a differenciálódás során is. A humán pluripotens őssejtek kalcium szignalizációjáról, azonban nem állt rendelkezésre információ.

4.3.1. Kalcium szignálok humán pluripotens őssejtekben

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

Első munkákban a kalcium jeleket vizsgáltuk hESC-kben és differenciált származékaikban; mezenchimális őssejt-szerű (MSCI) sejtekben és szívizomsejtekben, Fluo-4 fluoreszcens kalciumindikátor és konfokális mikroszkópia segítségével. Olyan „ősi” típusú receptorfajták ligandumainak hatását vizsgáltuk, amelyek az eukariótákban konzerváltak és így potenciálisan a differenciálatlan sejtekben is jelen vannak (1. táblázat).

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

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

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

A kapott eredmények összefoglalásaként elmondható, hogy az ATP csak a hESC-kben indukált kalcium jelet, az LPA és a tripszin gyors és kifejezett kalciumjeleket eredményezett

mind a HUES9, mind az MSC1 sejtekben. Az angiotenzin II kismértékű kalciumválaszt indukált a HUES9 sejtekben, és sokkal nagyobbat az MSC1 sejtekben. A hisztamin teljesen hatástalan volt a HUES9 sejtekben, míg erőteljes kalciumjelet indukált az MSC1 sejtekben, amit a sejtek nagy részében oszcilláló kalcium jelek követtek. A trombin vagy a GABA még viszonylag magas koncentrációban sem váltott ki kalcium jelet a hES sejtekben, míg a trombin az MSC1 sejtekben kalcium jelet okozott. A raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlást mindkét sejttypusban detektálni tudtuk. Ez az eredményünk nincs összhangban az előző vizsgálattal [96], ahol azt találták, hogy ATP adását követően csak a belső kalcium raktárakból mobilizálódik a kalcium. Mivel a raktárak ürüléséhez köthető kalcium beáramlás nagyon általános fiziológiás funkciókhoz köthető (mint például a sejtosztódás lásd [97]) és eger embrionális őssejtekben bizonyították is a SOCE és a folyamatban résztvevő fehérjék jelenlétét [98], így valószínűsíthető, hogy az általunk bemutatott eredmények közelebb állnak a fiziológiás folyamatokhoz, mint azt korábban leírták [96].

A mikroszkópos technika arra is lehetőséget nyújtott, hogy elkülönítsük a különböző sejtalkotókban megjelenő kalciumjeleket. Így azt is megmutattuk, hogy a Fluo-4 magi felhalmozódása nem változtatja a különböző indukálószerre adott válasz lefutását (lásd még [66]); a citoplazmában mérhető jelek kisebb intenzitásúak ugyan, azonban a lefutásuk pontosan megfelel a sejtmagban mérhető jeleknek (és így a kettő összegezve is reprezentálja a kalcium jeleket).

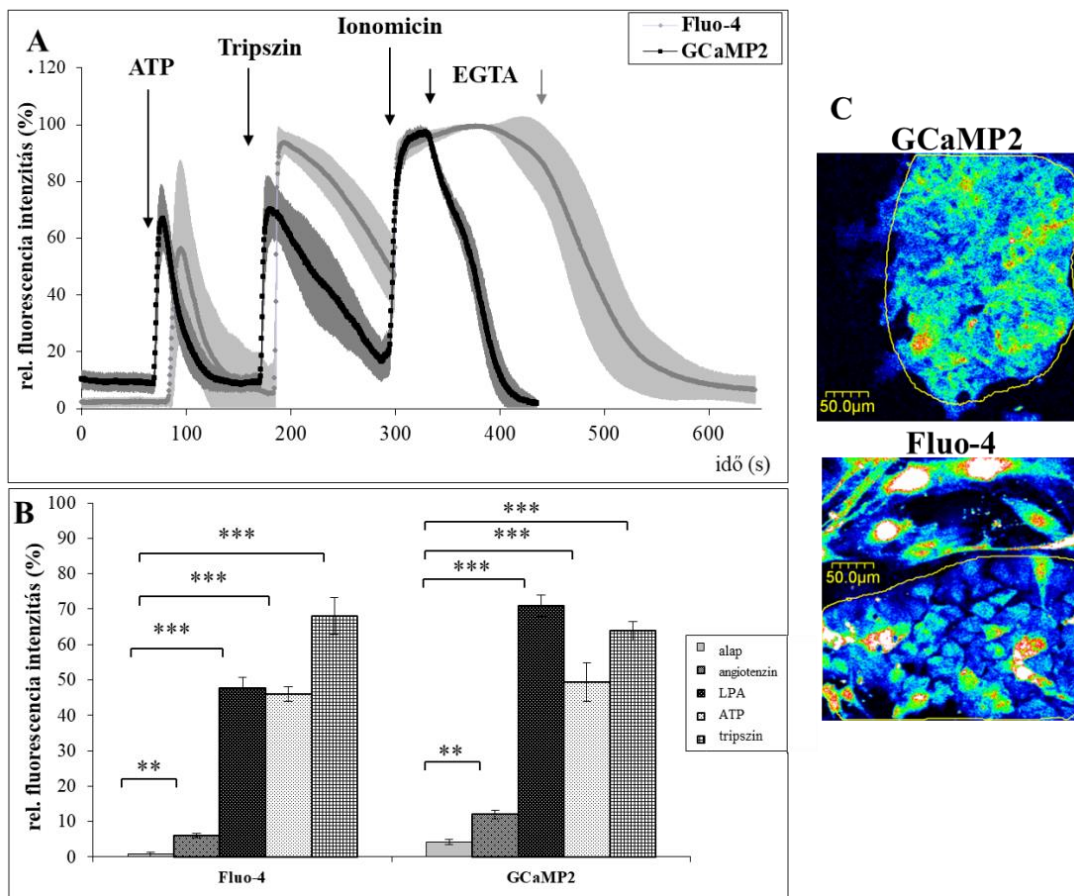
Összefoglalva elmondhatjuk, hogy sikerült a Fluo-4 fluoreszcens kalciumindikátor és a konfokális mikroszkópia segítségével megvalósítani a kalcium szint érzékeny és megbízható mérését hES sejtekben. Hogy a kalciumérzékeny festékek hátrányait kiküszöböljük a következő kísérletsorozatban a kalcium-érzékelő fehérjék egy változatát, a GCaMP2-t is használtuk.

4.3.2. Kalcium szignálok mérése genetikailag tervezett kalcium indikátorfehérjék segítségével

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

A hESC-kbe a GCaMP2 stabil kifejeződését SB transzpozonos génbeviteli technikával valósítottuk meg és megállapítottuk, hogy a transzgén a pluripotens tulajdonságokat nem változtatta meg. Ezután a jól ismert kalcium-mobilizáló szerek által kiváltott kalcium jeleket mértük, mind a GCaMP2-t kifejező, mind a Fluo-4-gyel töltött parentális pluripotens őssejtekben. A differenciálatlan hES-GCaMP2 sejtekben a különböző ligandumok, ATP, LPA, tripszin vagy angiotenzin II által indukált kalcium jelek hasonlóak voltak a Fluo-4-tel töltött sejtekben tapasztaltakhoz (6.A és C ábra). Az intracelluláris kalciumszint változások pedig szignifikánsnak bizonyultak az összes indukáló ágens (ATP, tripszin, LPA, angiotenzin

II) esetében (6.B ábra). A korábbi eredményeknek megfelelően sem a trombin, sem a hisztamin, sem a GABA nem váltott ki kalcium jelet.



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

Mechanikusan kiemelt dobogó szívizomtelepeken nekünk is sikerült megmutatnunk, hogy az összehúzódás és a citoplazmatikus kalcium szint összehangoltan működik. Az adrenalin és a koffein indukáló, illetve a verapamil gátló hatását is sikerült demonstrálnunk.

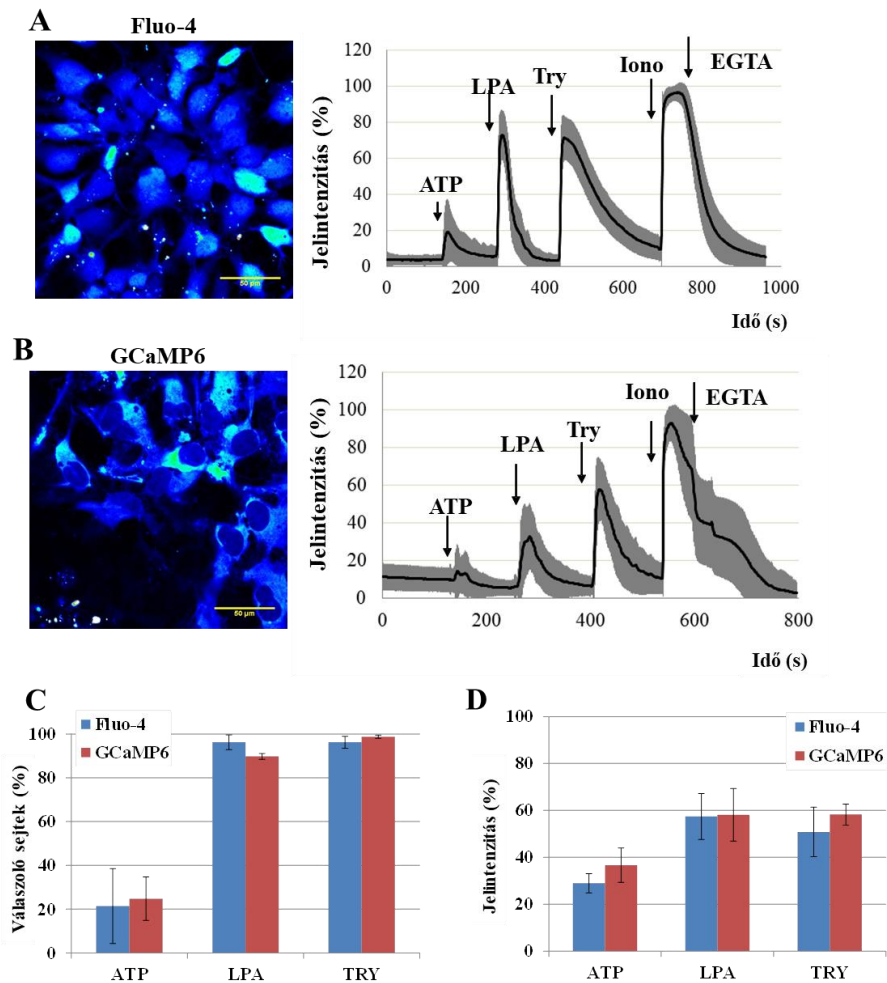
A pluripotens őssejtből származó szívizomsejteken végzett vizsgálataink további bizonyítékul szolgáltak ahhoz, hogy ezek a szívizomsejtek fiziológiai tulajdonságaikat tekintve közel állnak a humán szívizomsejtekhez.

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

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

A következő vizsgálatsorozatban hippokampális progenitorokat és idegsejteket hoztunk létre irányított differenciációval [81]. Azért választottuk ezt a sejtípust, mert a hippokampális sejtek vizsgálata nagyon érdekes több szempontból is; az idegrendszeri betegségek őssejt-alapú terápiájakor progenitor sejteket használnak [45], a hippokampuszban felnőtt korban is neurogenesis folyik [99], illetve a hippokampusz működési zavarait több betegségben is kimutatták [100]. Így a hippokampális sejtek érésének vizsgálata hozzásegíthet a hippokampusz működésének és működési zavarainak megértéséhez, ami a betegségek gyógyításában nagy segítséget nyújthat. Hogy a kalcium jelátvitelt festékkeltöltés nélkül tudjuk vizsgálni, stabilan expresszáltunk, egy idegsejtek kalcium jeleinek mérésére tovább fejlesztett kalciumindikátor fehérjét (GCaMP6fast) a neurális progenitor sejtekben (NPC). A GCaMP6f kifejeződése nem volt hatással sem az NPC-k génexpressziós mintázatára, sem a morfológiájára, sem pedig az idegi differenciálódási képességre.

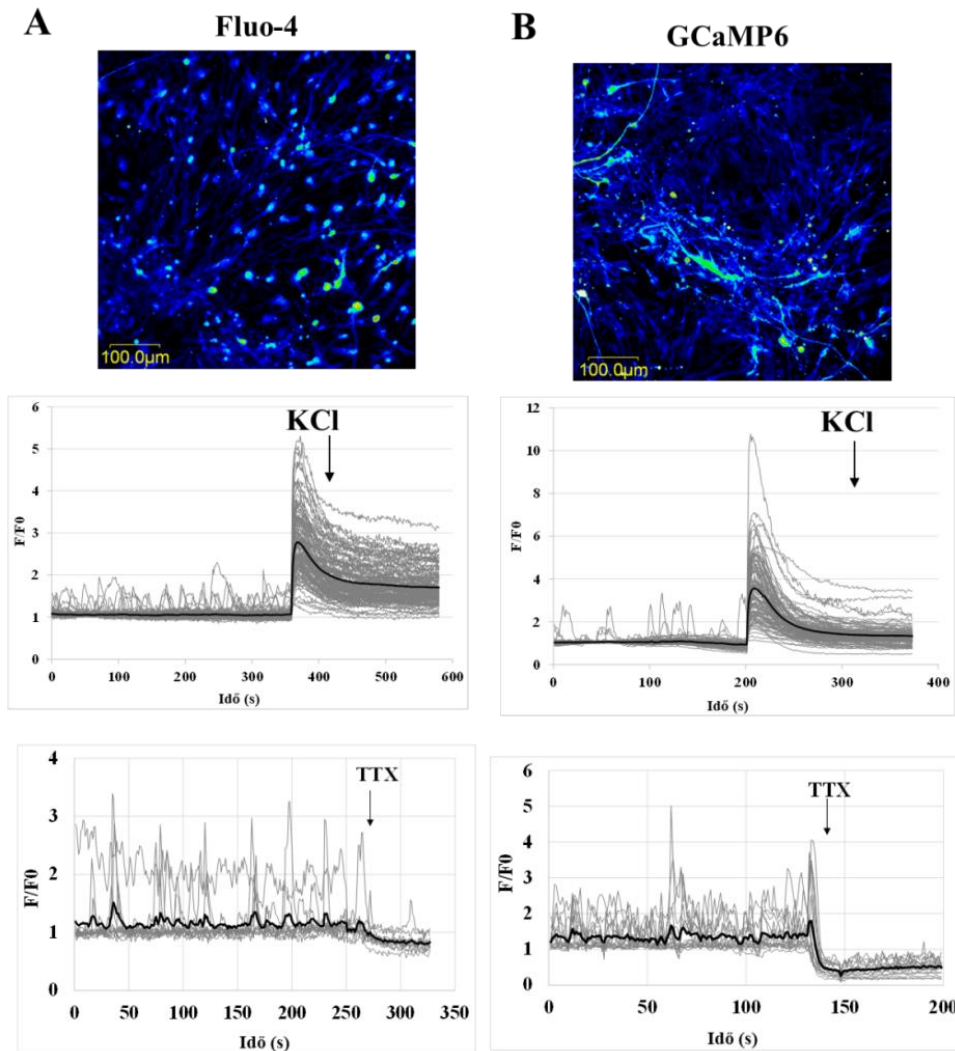
A GCaMP6f-ot kifejező illetve a Fluo-4 kalciumindikátor festékekkel töltött NPC-k Ca-jeleit vizsgálva azt találtuk, hogy az ATP, LPA vagy tripszin által indukált kalcium jelek hasonlóak mindkét módszer esetében, mind a válaszoló sejtek számát, mind a jelek nagyságát és lefutását tekintve (7. ábra).



7. ábra A szülői és a GCaMP6-ot expresszáló NPC-k kalciumjeleinek összehasonlítása. (A-B) Reprezentatív konfokális mikroszkópos képek és kalcium mérések Fluo-4-el töltött NPC-k (A) vagy GCaMP6-ot expresszáló NPC-k (B) esetében. A grafikonon a szignálintenzitás átlagértékeket \pm SD mutatjuk be (A: $n=200$, B: $n=129$). A kalciumjeleket ATP (100 μ M), LPA (10 μ M), alacsony koncentrációjú tripszin (2,5 μ g/ml) és ionomicin (5 μ M) hozzáadásával mértük - a szerek hozzáadását a megfelelő nyilak mutatják. A kalcium-függő fluoreszcencia maximális és minimális szintjét ionomicin jelenlétében, illetve feleslegben lévő EGTA hozzáadása után határoztuk meg, és a celluláris kalciumszinteket erre a kalibrált tartományára ($F_{max}-F_{min}$) normalizáltuk. (C-D) Különböző indukálószer hatása a reagáló sejtek számára (C) és a kalciumjel intenzitására (D) a Fluo-4-tel töltött és a GCaMP6-ot expresszáló NPC-k esetében. Az értékek 3 független kísérlet (Fluo-4: $n_1=265$, $n_2=200$, $n_3=181$, GCaMP6: $n_1=82$, $n_2=77$, $n_3=129$) szignálintenzitás átlagértékeit \pm SD mutatják. Egyik esetben sem találtunk szignifikáns különbséget a Fluo-4-tel töltött és a GCaMP6-ot expresszáló sejtek között (kétmintás t -teszt, $p>0,05$).

Ezt követően a hippocampális NPC-kből PROX1-et expresszáló DG neuronokat differenciáltattunk és a 4-5 hetes differenciálódó kultúrákon vizsgáltuk a kalcium jeleket (8. ábra). Az idegsejtek kifejezett kalcium jellel reagáltak a KCl okozta membránpotenciál változásra és spontán aktivitást is mutattak, ami a differenciálódás során kialakult összetett

neuronhálózatot jól érzékelteti. Az egyes idegsejtekben megfigyelt gyors, részlegesen kapcsolt, spontán kalcium tranzienseket 100 μ M tetrodotoxin (TTX) teljesen megszüntette. A TTX-el szembeni érzékenység azt mutatja, hogy ezekben az idegsejtekben a spontán kalcium aktivitás akcióspotenciál függő.



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

A kalciumindikátor fehérje jelenléte lehetővé tette, hogy az idegsejtek érési folyamatát a kalcium jel változásainak érzékeny, ismételtető detektálása során is kövessük. Eredményeinkkel hozzájárultunk, hogy a hPSC-ből differenciáltatott idegi sejtípusok vizsgálata egyre szélesebb körben elfogadott és használt technika legyen [101-103].

4.4. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek jellemzői és felhasználási lehetőségeik

4.4.1. Pluripotens őssejt eredetű mezenchimális őssejtek immunológiai tulajdonságai

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

A pluripotens őssejtekből elméletben minden testi sejt létrehozható és a laboratóriumunkban mi is többféle differenciációs protokollt honosítottunk, fejlesztettünk és optimalizáltunk (mezenchimális őssejt [79, 80, 104]; szívizomsejt [82, 84, 85, 105], idegsejt [86, 89, 106, 107], endotél sejt [78] és hepatocita [108, 109] irányba). Ezek közül kiemelem, és itt bemutatom azokat a munkákat, amelyekben pluripotens őssejtből multipotens mezenchimális őssejteket (MSC) hoztunk létre és használtunk betegségmodellezésre.

A HUES9 őssejtekből olyan sejteket differenciáltattunk, amelyek dajkasejtként használhatóak a kiindulási HUES9 sejtek tenyésztésére. A differenciációs protokoll nagyon egyszerű volt, a spontán differenciáció során létrejött fibroblaszt-szerű sejteket limitált tripszinezéssel és néhány átültetéssel homogénné lehet tenni. Az így létrehozott sejtek alkalmas dajkasejtnek bizonyultak a hES sejtek tenyésztéséhez. A létrehozott klónok közül a „2” számú bizonyult a legsikeresebbnek (MSC1-2), ezen ellenőriztük, hogy megfelel-e a „Mesenchymal and Tissue Stem Cell Committee of the International Society for Cellular Therapy” [110] által szabott kritériumoknak. Kimutattuk, hogy az MSC1-2 sejtek differenciálhatók a kanonikus mezodermális (osteoblaszt, kondrogén, adipogén) irányok felé és felszíni marker expressziójuk is megfelel a kritériumoknak.

Az MSC-k terápiaán is jelentős tulajdonsága, hogy immunszuppresszívek, mind *in vitro*, mind *in vivo* gátolják az immunválaszokat [111, 112]. Mitogén által kiváltott T-sejt proliferációt gátlást vizsgáltunk az MSC1-2, a HFF-1 (humán fibroblaszt) és bmMSC (csontvelő eredetű MSC) sejtek immunszuppresszív tulajdonságainak összehasonlítására. Egészséges donorok humán PBMC-jét aktiváltuk ConavalinA (ConA) vagy fitohemagglutinin (PHA) mitogén aktivátorokkal, és azt vizsgáltuk, hogy hogyan befolyásolják a mezenchimális sejtek az aktivált sejtek növekedését.

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

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

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

A Frank Ter Haar szindrómában szenvedő betegekben az *SH3PXD2b* gén mindkét alléljában jelenlévő mutációk a TKS4 fehérje elvesztéséhez vezetnek, ami súlyos fejlődési rendellenességet okoz. Mivel a betegség modellezésére humán modell még nem állt rendelkezésre, ezért CRISPR-Cas9 genomszerkesztési technika segítségével mutációkat hoztunk létre az *SH3PXD2b* gén 2. exonjában, és a létrejött klónok közül kiválasztottuk azokat, amelyekben homo- illetve heterozigóta módon történt meg a genomszerkesztés.

A TKS4 fehérje hiányát a homozigóta (TKS4-KO) illetve a TKS4 fehérje csökkent kifejeződését a heterozigóta HUES9 klónokban Western blot analízissel és fluoreszcens immuncitokémiával is igazoltuk. Miután ellenőriztük a szokott módon, hogy a genomszerkesztés nem befolyásolta a klónok pluripotens tulajdonságait, a homozigóta klónokból MSC-eket differenciáltattunk. Az MSC-k fenotipusos jellemzése után a mezenchimális differenciációs folyamatokra összpontosítva azt figyeltük meg, hogy a sejt-elköteleződéshez kapcsolódó markerek a TKS4-KO MSC klónokban jelentősen csökkentek. A mezoderma markerek (Snail és FoxA2) és a csontszövet képződésében szerepet játszó GATA4 és gooseoid (GSC) transzkripciós faktorok expressziós szintjének csökkenése a TKS4-KO MSC klónokban arra utal, hogy a TKS4 hiánya esetén az MSC differenciálódás megváltozhat és kevésbé erőteljes, mint a WT sejtekben. Ezek az adatok összhangban vannak azzal a megfigyeléssel, hogy a TKS4 fontos szerepet játszik a csontszövet képződésében, ami összefüggésben lehet az FTHS betegek csontfejlődési defektusával. A megfigyelt EMT-szerű események (azaz megnövekedett mátrix lebontó képesség és csökkent E-Cadherin és Snail fehérje szint) a TKS4-KO hMSC-kben arra utalnak, hogy a differenciálódási folyamat kinetikája hatással lehet a TKS4 mennyisége, ami megváltozott differenciált szöveti összetételt eredményezhet. Összefoglalva, a tanulmány legfontosabb eredménye, hogy létrehoztunk egy *in vitro* humán modellt a TKS4 fehérje hatásainak tanulmányozására olyan őssejtekben, amelyek képesek mindhárom csíralemez irányába és így FTHS által érintett sejttypusokká is differenciálódni.

5. AZ ÚJ TUDOMÁNYOS EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

I. Humán pluripotens őssejtvonalak létrehozása, tenyésztése és jellemzése

Létrehoztunk több humán pluripotens őssejtvonalat sejtbiológiai vizsgálatok és betegségmodellezés céljából. A sejtbiológiai vizsgálatokhoz az ABCG2 különböző mutánsainak eGFP-vel címkézett változatait kifejező őssejtvonalakat, a kalcium szignalizáció vizsgálatához pedig humán pluripotens őssejt eredetű neurális progenitorokat, amelyek a GCaMP6fast kalciumindikátor fehérjét fejezték ki. A Frank Ter Haar szindróma modellezéséhez a HUES9 embrionális őssejtvonalból a CRISPR/Cas9 génszerkesztési technikát használva létrehoztunk *SH3PXD2* gén mutáns őssejtklónokat. II. típusú diabéteszes ikerpár vérsejtjeiből pedig Sendai vírus segítségével készítettünk indukált pluripotens őssejtvonalakat. A létrehozott vonalakat a beállított módszerekkel részletesen jellemeztük.

II. A pluripotens állapotra jellemző tulajdonságok megismerése és funkcionális vizsgálata

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

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

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

III. Pluripotens őssejtek alkalmazása

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

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

7. A DISSZERTÁCIÓ ALAPJÁT KÉPEZŐ KÖZLEMÉNYEK

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

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

IF:2,02

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

IF:4,543

Független idéző: 47

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

IF: 8,751

Független idéző: 15

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

IF: 2,592

Független idéző: 16

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

IF: 2,461

Független idéző: 12

6. Erdei Z, Schamberger A, Török G, Szebényi K, Várady G, Orbán TI, Homolya L, Sarkadi B, **Apáti Á.** Generation of multidrug resistant human tissues by overexpression of the ABCG2 multidrug transporter in embryonic stem cells. *PLoS One.* 2018 Apr 12;13(4):e0194925. doi: 10.1371/journal.pone.0194925. PMID: 29649238; PMCID: PMC5896897.

IF: 2,776

Független idéző: 6

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

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

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

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

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

Köszönöm a mindenkorai munkahelyemnek (OVSZ és TTK) a kutatásainkhoz biztosított háttérrel és a támogatást mindazon szakmai szervezeteknek, amelyek révén a bemutatott projektek folyamatos pénzügyi támogatást élveztek.

Hálásan köszönöm a családomnak – édesanyámnak, gyermekeimnek, páromnak- és barátaimnak, a meg nem szűnő támogatást és szeretetet!

10. IRODALOMJEGYZÉK

1. Evans, M. J.; Kaufman, M. H. Establishment in culture of pluripotential cells from mouse embryos. *Nature* **1981**, *292*, 154-6.10.1038/292154a0
2. Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science* **1998**, *282*, 1145-7.10.1126/science.282.5391.1145
3. Reubinoff, B. E.; Pera, M. F.; Fong, C. Y.; Trounson, A.; Bongso, A. Embryonic stem cell lines from human blastocysts: somatic differentiation in vitro. *Nat Biotechnol* **2000**, *18*, 399-404.10.1038/74447
4. Itskovitz-Eldor, J.; Schuldiner, M.; Karsenti, D.; Eden, A.; Yanuka, O.; Amit, M.; Soreq, H.; Benvenisty, N. Differentiation of human embryonic stem cells into embryoid bodies compromising the three embryonic germ layers. *Mol Med* **2000**, *6*, 88-95, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10859025>
5. Kehat, I.; Kenyagin-Karsenti, D.; Snir, M.; Segev, H.; Amit, M.; Gepstein, A.; Livne, E.; Binah, O.; Itskovitz-Eldor, J.; Gepstein, L. Human embryonic stem cells can differentiate into myocytes with structural and functional properties of cardiomyocytes. *J Clin Invest* **2001**, *108*, 407-14.10.1172/JCI12131
6. Carpenter, M. K.; Inokuma, M. S.; Denham, J.; Mujtaba, T.; Chiu, C. P.; Rao, M. S. Enrichment of neurons and neural precursors from human embryonic stem cells. *Exp Neurol* **2001**, *172*, 383-97.10.1006/exnr.2001.7832
7. Assady, S.; Maor, G.; Amit, M.; Itskovitz-Eldor, J.; Skorecki, K. L.; Tzukerman, M. Insulin production by human embryonic stem cells. *Diabetes* **2001**, *50*, 1691-7.10.2337/diabetes.50.8.1691
8. Zhang, S. C.; Wernig, M.; Duncan, I. D.; Brustle, O.; Thomson, J. A. In vitro differentiation of transplantable neural precursors from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol* **2001**, *19*, 1129-33.10.1038/nbt1201-1129
9. Boyer, L. A.; Lee, T. I.; Cole, M. F.; Johnstone, S. E.; Levine, S. S.; Zucker, J. P.; Guenther, M. G.; Kumar, R. M.; Murray, H. L.; Jenner, R. G.; Gifford, D. K.; Melton, D. A.; Jaenisch, R.; Young, R. A. Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* **2005**, *122*, 947-56.10.1016/j.cell.2005.08.020
10. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell* **2006**, *126*, 663-76.10.1016/j.cell.2006.07.024
11. Takahashi, K.; Tanabe, K.; Ohnuki, M.; Narita, M.; Ichisaka, T.; Tomoda, K.; Yamanaka, S. Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors. *Cell* **2007**, *131*, 861-72.10.1016/j.cell.2007.11.019
12. Lowry, W. E.; Plath, K. The many ways to make an iPS cell. *Nat Biotechnol* **2008**, *26*, 1246-8.10.1038/nbt1108-1246
13. Mostoslavsky, G. Concise review: The magic act of generating induced pluripotent stem cells: many rabbits in the hat. *Stem Cells* **2012**, *30*, 28-32.10.1002/stem.742
14. Xu, C.; Jiang, J.; Sottile, V.; McWhir, J.; Lebkowski, J.; Carpenter, M. K. Immortalized fibroblast-like cells derived from human embryonic stem cells support undifferentiated cell growth. *Stem Cells* **2004**, *22*, 972-80.10.1634/stemcells.22-6-972
15. Martins-Taylor, K.; Xu, R. H. Concise review: Genomic stability of human induced pluripotent stem cells. *Stem Cells* **2012**, *30*, 22-7.10.1002/stem.705
16. Zhu, Z.; Huangfu, D. Human pluripotent stem cells: an emerging model in developmental biology. *Development* **2013**, *140*, 705-17.10.1242/dev.086165
17. Worley, K. E.; Rico-Varela, J.; Ho, D.; Wan, L. Q. Teratogen screening with human pluripotent stem cells. *Integr Biol (Camb)* **2018**, *10*, 491-501.10.1039/c8ib00082d
18. Sison-Young, R. L.; Kia, R.; Heslop, J.; Kelly, L.; Rowe, C.; Cross, M. J.; Kitteringham, N. R.; Hanley, N.; Park, B. K.; Goldring, C. E. Human pluripotent stem cells for modeling toxicity. *Adv Pharmacol* **2012**, *63*, 207-56.10.1016/B978-0-12-398339-8.00006-9
19. Engle, S. J.; Blaha, L.; Kleiman, R. J. Best Practices for Translational Disease Modeling Using Human iPSC-Derived Neurons. *Neuron* **2018**, *100*, 783-797.10.1016/j.neuron.2018.10.033
20. Karagiannis, P.; Takahashi, K.; Saito, M.; Yoshida, Y.; Okita, K.; Watanabe, A.; Inoue, H.; Yamashita, J. K.; Todani, M.; Nakagawa, M.; Osawa, M.; Yashiro, Y.; Yamanaka, S.; Osafune, K. Induced Pluripotent Stem Cells and Their Use in Human Models of Disease and Development. *Physiol Rev* **2019**, *99*, 79-114.10.1152/physrev.00039.2017

21. Lancaster, M. A.; Knoblich, J. A. Organogenesis in a dish: modeling development and disease using organoid technologies. *Science* **2014**, *345*, 1247125.10.1126/science.1247125
22. Turek, I. S.; Hanlon, T. E. The effectiveness and safety of electroconvulsive therapy (ECT). *J Nerv Ment Dis* **1977**, *164*, 419-31.10.1097/00005053-197706000-00008
23. Yamanaka, S. Pluripotent Stem Cell-Based Cell Therapy-Promise and Challenges. *Cell Stem Cell* **2020**, *27*, 523-531.10.1016/j.stem.2020.09.014
24. Harding, J.; Vintersten-Nagy, K.; Nagy, A. Universal Stem Cells: Making the Unsafe Safe. *Cell Stem Cell* **2020**, *27*, 198-199.10.1016/j.stem.2020.07.004
25. Lanza, R.; Russell, D. W.; Nagy, A. Engineering universal cells that evade immune detection. *Nat Rev Immunol* **2019**, *19*, 723-733.10.1038/s41577-019-0200-1
26. Liang, Q.; Monetti, C.; Shutova, M. V.; Neely, E. J.; Hacibekiroglu, S.; Yang, H.; Kim, C.; Zhang, P.; Li, C.; Nagy, K.; Mileikovsky, M.; Gyongy, I.; Sung, H. K.; Nagy, A. Linking a cell-division gene and a suicide gene to define and improve cell therapy safety. *Nature* **2018**, *563*, 701-704.10.1038/s41586-018-0733-7
27. Kelava, I.; Lancaster, M. A. Dishing out mini-brains: Current progress and future prospects in brain organoid research. *Dev Biol* **2016**, *420*, 199-209.10.1016/j.ydbio.2016.06.037
28. Lancaster, M. A.; Renner, M.; Martin, C. A.; Wenzel, D.; Bicknell, L. S.; Hurles, M. E.; Homfray, T.; Penninger, J. M.; Jackson, A. P.; Knoblich, J. A. Cerebral organoids model human brain development and microcephaly. *Nature* **2013**, *501*, 373-9.10.1038/nature12517
29. Kanton, S.; Boyle, M. J.; He, Z.; Santel, M.; Weigert, A.; Sanchis-Calleja, F.; Guijarro, P.; Sidow, L.; Fleck, J. S.; Han, D.; Qian, Z.; Heide, M.; Huttner, W. B.; Khaitovich, P.; Paabo, S.; Treutlein, B.; Camp, J. G. Organoid single-cell genomic atlas uncovers human-specific features of brain development. *Nature* **2019**, *574*, 418-422.10.1038/s41586-019-1654-9
30. Shroff, T.; Aina, K.; Maass, C.; Cipriano, M.; Lambrecht, J.; Tacke, F.; Mosig, A.; Loskill, P. Studying metabolism with multi-organ chips: new tools for disease modelling, pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Open Biol* **2022**, *12*, 210333.10.1098/rsob.210333
31. Prockop, D. J. Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* **1997**, *276*, 71-4.10.1126/science.276.5309.71
32. Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D.; Moorman, M. A.; Simonetti, D. W.; Craig, S.; Marshak, D. R. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* **1999**, *284*, 143-7.10.1126/science.284.5411.143
33. Wagner, W.; Wein, F.; Seckinger, A.; Frankhauser, M.; Wirkner, U.; Krause, U.; Blake, J.; Schwager, C.; Eckstein, V.; Ansoorge, W.; Ho, A. D. Comparative characteristics of mesenchymal stem cells from human bone marrow, adipose tissue, and umbilical cord blood. *Exp Hematol* **2005**, *33*, 1402-16.10.1016/j.exphem.2005.07.003
34. Wang, H. S.; Hung, S. C.; Peng, S. T.; Huang, C. C.; Wei, H. M.; Guo, Y. J.; Fu, Y. S.; Lai, M. C.; Chen, C. C. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells* **2004**, *22*, 1330-7.10.1634/stemcells.2004-0013
35. Zhou, T.; Yuan, Z.; Weng, J.; Pei, D.; Du, X.; He, C.; Lai, P. Challenges and advances in clinical applications of mesenchymal stromal cells. *J Hematol Oncol* **2021**, *14*, 24.10.1186/s13045-021-01037-x
36. de Matos, B. M.; Robert, A. W.; Stimamiglio, M. A.; Correa, A. Pluripotent-derived Mesenchymal Stem/stromal Cells: an Overview of the Derivation Protocol Efficacies and the Differences Among the Derived Cells. *Stem Cell Rev Rep* **2022**, *18*, 94-125.10.1007/s12015-021-10258-z
37. Abdal Dayem, A.; Lee, S. B.; Kim, K.; Lim, K. M.; Jeon, T. I.; Seok, J.; Cho, A. S. Production of Mesenchymal Stem Cells Through Stem Cell Reprogramming. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*.10.3390/ijms20081922
38. Hartman, M. E.; Dai, D. F.; Laflamme, M. A. Human pluripotent stem cells: Prospects and challenges as a source of cardiomyocytes for in vitro modeling and cell-based cardiac repair. *Adv Drug Deliv Rev* **2016**, *96*, 3-17.10.1016/j.addr.2015.05.004
39. Liang, P.; Lan, F.; Lee, A. S.; Gong, T.; Sanchez-Freire, V.; Wang, Y.; Diecke, S.; Sallam, K.; Knowles, J. W.; Wang, P. J.; Nguyen, P. K.; Bers, D. M.; Robbins, R. C.; Wu, J. C. Drug screening using a library of human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes reveals disease-specific patterns of cardiotoxicity. *Circulation* **2013**, *127*, 1677-91.10.1161/CIRCULATIONAHA.113.001883

40. Magdy, T.; Schuldt, A. J. T.; Wu, J. C.; Bernstein, D.; Burridge, P. W. Human Induced Pluripotent Stem Cell (hiPSC)-Derived Cells to Assess Drug Cardiotoxicity: Opportunities and Problems. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **2018**, *58*, 83-103.10.1146/annurev-pharmtox-010617-053110
41. Bekhite, M. M.; Schulze, P. C. Human Induced Pluripotent Stem Cell as a Disease Modeling and Drug Development Platform-A Cardiac Perspective. *Cells* **2021**, 10.10.3390/cells10123483
42. Funakoshi, S.; Yoshida, Y. Recent progress of iPSC technology in cardiac diseases. *Arch Toxicol* **2021**, *95*, 3633-3650.10.1007/s00204-021-03172-3
43. Marchetto, M. C.; Winner, B.; Gage, F. H. Pluripotent stem cells in neurodegenerative and neurodevelopmental diseases. *Hum Mol Genet* **2010**, *19*, R71-6.10.1093/hmg/ddq159
44. Silva, M. C.; Haggarty, S. J. Human pluripotent stem cell-derived models and drug screening in CNS precision medicine. *Ann N Y Acad Sci* **2020**, *1471*, 18-56.10.1111/nyas.14012
45. Kim, T. W.; Koo, S. Y.; Studer, L. Pluripotent Stem Cell Therapies for Parkinson Disease: Present Challenges and Future Opportunities. *Front Cell Dev Biol* **2020**, *8*, 729.10.3389/fcell.2020.00729
46. Apati, A.; Varga, N.; Berecz, T.; Erdei, Z.; Homolya, L.; Sarkadi, B. Application of human pluripotent stem cells and pluripotent stem cell-derived cellular models for assessing drug toxicity. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2019**, *15*, 61-75.10.1080/17425255.2019.1558207
47. Dolatshad, H.; Tatwavedi, D.; Ahmed, D.; Tegethoff, J. F.; Boultonwood, J.; Pellagatti, A. Application of induced pluripotent stem cell technology for the investigation of hematological disorders. *Adv Biol Regul* **2019**, *71*, 19-33.10.1016/j.jbior.2018.10.001
48. Hung, S. S. C.; Khan, S.; Lo, C. Y.; Hewitt, A. W.; Wong, R. C. B. Drug discovery using induced pluripotent stem cell models of neurodegenerative and ocular diseases. *Pharmacol Ther* **2017**, *177*, 32-43.10.1016/j.pharmthera.2017.02.026
49. Ye, L.; Ni, X.; Zhao, Z. A.; Lei, W.; Hu, S. The Application of Induced Pluripotent Stem Cells in Cardiac Disease Modeling and Drug Testing. *J Cardiovasc Transl Res* **2018**, *11*, 366-374.10.1007/s12265-018-9811-3
50. Avior, Y.; Sagi, I.; Benvenisty, N. Pluripotent stem cells in disease modelling and drug discovery. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2016**, *17*, 170-82.10.1038/nrm.2015.27
51. Ben Jehuda, R.; Shemer, Y.; Binah, O. Genome Editing in Induced Pluripotent Stem Cells using CRISPR/Cas9. *Stem Cell Rev Rep* **2018**, *14*, 323-336.10.1007/s12015-018-9811-3
52. Durand, B.; Stoetzel, C.; Schaefer, E.; Calmels, N.; Scheidecker, S.; Kempf, N.; De Melo, C.; Guilbert, A. S.; Timbolschi, D.; Donato, L.; Astruc, D.; Sauer, A.; Antal, M. C.; Dollfus, H.; El Chehadeh, S. A severe case of Frank-ter Haar syndrome and literature review: Further delineation of the phenotypical spectrum. *Eur J Med Genet* **2020**, *63*, 103857.10.1016/j.ejmg.2020.103857
53. Massadeh, S.; Alhabshan, F.; AlSudairi, H. N.; Alkwai, S.; Alsuwailm, M.; Kabbani, M. S.; Chaikhouni, F.; Alaamery, M. The Role of the Disrupted Podosome Adaptor Protein (SH3PXD2B) in Frank-Ter Haar Syndrome. *Genes (Basel)* **2022**, *13*.10.3390/genes13020236
54. Iqbal, Z.; Cejudo-Martin, P.; de Brouwer, A.; van der Zwaag, B.; Ruiz-Lozano, P.; Scimia, M. C.; Lindsey, J. D.; Weinreb, R.; Albrecht, B.; Megarbane, A.; Alanay, Y.; Ben-Neriah, Z.; Amenduni, M.; Artuso, R.; Veltman, J. A.; van Beusekom, E.; Oudakker, A.; Millan, J. L.; Hennekam, R.; Hamel, B.; Courtneidge, S. A.; van Bokhoven, H. Disruption of the podosome adaptor protein TKS4 (SH3PXD2B) causes the skeletal dysplasia, eye, and cardiac abnormalities of Frank-Ter Haar Syndrome. *Am J Hum Genet* **2010**, *86*, 254-61.10.1016/j.ajhg.2010.01.009
55. Dean, M.; Moitra, K.; Allikmets, R. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Hum Mutat* **2022**, *43*, 1162-1182.10.1002/humu.24418
56. Sarkadi, B.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Varadi, A. Human multidrug resistance ABCB and ABCG transporters: participation in a chemoinmunity defense system. *Physiol Rev* **2006**, *86*, 1179-236.10.1152/physrev.00037.2005
57. Apati, A.; Szebenyi, K.; Erdei, Z.; Varady, G.; Orban, T. I.; Sarkadi, B. The importance of drug transporters in human pluripotent stem cells and in early tissue differentiation. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* **2016**, *12*, 77-92.10.1517/17425255.2016.1121382
58. Krishnamurthy, P.; Ross, D. D.; Nakanishi, T.; Bailey-Dell, K.; Zhou, S.; Mercer, K. E.; Sarkadi, B.; Sorrentino, B. P.; Schuetz, J. D. The stem cell marker Bcrp/ABCG2 enhances hypoxic cell survival through interactions with heme. *J Biol Chem* **2004**, *279*, 24218-25.10.1074/jbc.M313599200
59. Sarkadi, B.; Ozvegy-Laczka, C.; Nemet, K.; Varadi, A. ABCG2 -- a transporter for all seasons. *FEBS Lett* **2004**, *567*, 116-20.10.1016/j.febslet.2004.03.123
60. Zelinski, T.; Coghlan, G.; Liu, X. Q.; Reid, M. E. ABCG2 null alleles define the Jr(a-) blood group phenotype. *Nat Genet* **2012**, *44*, 131-2.10.1038/ng.1075

61. Saison, C.; Helias, V.; Ballif, B. A.; Peyrard, T.; Puy, H.; Miyazaki, T.; Perrot, S.; Vayssier-Taussat, M.; Waldner, M.; Le Pennec, P. Y.; Cartron, J. P.; Arnaud, L. Null alleles of ABCG2 encoding the breast cancer resistance protein define the new blood group system Junior. *Nat Genet* **2012**, *44*, 174-7.10.1038/ng.1070
62. Yuste, R.; Peinado, A.; Katz, L. C. Neuronal domains in developing neocortex. *Science* **1992**, *257*, 665-9.10.1126/science.1496379
63. Hussar, D. A. Drug interactions. *Clin Toxicol* **1976**, *9*, 107-18.10.3109/15563657608995412
64. Ran, C.; Chen, X. Probing the coding logic of thermosensation using spinal cord calcium imaging. *Exp Neurol* **2019**, *318*, 42-49.10.1016/j.expneurol.2019.04.009
65. Paredes, R. M.; Etzler, J. C.; Watts, L. T.; Zheng, W.; Lechleiter, J. D. Chemical calcium indicators. *Methods* **2008**, *46*, 143-51.10.1016/j.ymeth.2008.09.025
66. Apati, A.; Paszty, K.; Erdei, Z.; Szebenyi, K.; Homolya, L.; Sarkadi, B. Calcium signaling in pluripotent stem cells. *Mol Cell Endocrinol* **2012**, *353*, 57-67.10.1016/j.mce.2011.08.038
67. Gee, K. R.; Brown, K. A.; Chen, W. N.; Bishop-Stewart, J.; Gray, D.; Johnson, I. Chemical and physiological characterization of fluo-4 Ca(2+)-indicator dyes. *Cell Calcium* **2000**, *27*, 97-106.10.1054/ceca.1999.0095
68. Thomas, D.; Tovey, S. C.; Collins, T. J.; Bootman, M. D.; Berridge, M. J.; Lipp, P. A comparison of fluorescent Ca²⁺ indicator properties and their use in measuring elementary and global Ca²⁺ signals. *Cell Calcium* **2000**, *28*, 213-23.10.1054/ceca.2000.0152
69. Horikawa, K. Recent progress in the development of genetically encoded Ca²⁺ indicators. *J Med Invest* **2015**, *62*, 24-8.10.2152/jmi.62.24
70. Zhang, D.; Redington, E.; Gong, Y. Rational engineering of ratiometric calcium sensors with bright green and red fluorescent proteins. *Commun Biol* **2021**, *4*, 924.10.1038/s42003-021-02452-z
71. Hendel, T.; Mank, M.; Schnell, B.; Griesbeck, O.; Borst, A.; Reiff, D. F. Fluorescence changes of genetic calcium indicators and OGB-1 correlated with neural activity and calcium in vivo and in vitro. *J Neurosci* **2008**, *28*, 7399-411.10.1523/JNEUROSCI.1038-08.2008
72. Maiter, D.; Underwood, L. E.; Martin, J. B.; Koenig, J. I. Neonatal treatment with monosodium glutamate: effects of prolonged growth hormone (GH)-releasing hormone deficiency on pulsatile GH secretion and growth in female rats. *Endocrinology* **1991**, *128*, 1100-6.10.1210/endo-128-2-1100
73. McCombs, J. E.; Palmer, A. E. Measuring calcium dynamics in living cells with genetically encodable calcium indicators. *Methods* **2008**, *46*, 152-9.10.1016/j.ymeth.2008.09.015
74. Tallini, Y. N.; Brekke, J. F.; Shui, B.; Doran, R.; Hwang, S. M.; Nakai, J.; Salama, G.; Segal, S. S.; Kotlikoff, M. I. Propagated endothelial Ca²⁺ waves and arteriolar dilation in vivo: measurements in Cx40BAC GCaMP2 transgenic mice. *Circ Res* **2007**, *101*, 1300-9.10.1161/CIRCRESAHA.107.149484
75. Szebenyi, K.; Furedi, A.; Kolacsek, O.; Csohany, R.; Prokai, A.; Kis-Petik, K.; Szabo, A.; Bosze, Z.; Bender, B.; Tovari, J.; Enyedi, A.; Orban, T. I.; Apati, A.; Sarkadi, B. Visualization of Calcium Dynamics in Kidney Proximal Tubules. *J Am Soc Nephrol* **2015**, *26*, 2731-40.10.1681/ASN.2014070705
76. Kotlikoff, M. I. Genetically encoded Ca²⁺ indicators: using genetics and molecular design to understand complex physiology. *J Physiol* **2007**, *578*, 55-67.10.1113/jphysiol.2006.120212
77. Szebenyi, K.; Furedi, A.; Kolacsek, O.; Pergel, E.; Bosze, Z.; Bender, B.; Vajdovich, P.; Tovari, J.; Homolya, L.; Szakacs, G.; Heja, L.; Enyedi, A.; Sarkadi, B.; Apati, A.; Orban, T. I. Generation of a Homozygous Transgenic Rat Strain Stably Expressing a Calcium Sensor Protein for Direct Examination of Calcium Signaling. *Sci Rep* **2015**, *5*, 12645.10.1038/srep12645
78. Berecz, T.; Husveth-Toth, M.; Mioulane, M.; Merkely, B.; Apati, A.; Foldes, G. Generation and Analysis of Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes and Endothelial Cells for High Content Screening Purposes. *Methods Mol Biol* **2020**, *2150*, 57-77.10.1007/7651_2019_222
79. Varga, N.; Vereb, Z.; Rajnavolgyi, E.; Nemet, K.; Uher, F.; Sarkadi, B.; Apati, A. Mesenchymal stem cell like (MSCI) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth. *Biochem Biophys Res Commun* **2011**, *414*, 474-80.10.1016/j.bbrc.2011.09.089
80. Laszlo, L.; Maczelka, H.; Takacs, T.; Kurilla, A.; Tilajka, A.; Buday, L.; Vas, V.; Apati, A. A Novel Cell-Based Model for a Rare Disease: The Tks4-KO Human Embryonic Stem Cell Line as a Frank-Ter Haar Syndrome Model System. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*.10.3390/ijms23158803
81. Yu, D. X.; Di Giorgio, F. P.; Yao, J.; Marchetto, M. C.; Brennand, K.; Wright, R.; Mei, A.; McHenry, L.; Lisuk, D.; Grasmick, J. M.; Silberman, P.; Silberman, G.; Jappelli, R.; Gage, F. H.

- Modeling hippocampal neurogenesis using human pluripotent stem cells. *Stem Cell Reports* **2014**, *2*, 295-310.10.1016/j.stemcr.2014.01.009
82. Apati, A.; Paszty, K.; Hegedus, L.; Kolacsek, O.; Orban, T. I.; Erdei, Z.; Szebenyi, K.; Pentek, A.; Enyedi, A.; Sarkadi, B. Characterization of calcium signals in human embryonic stem cells and in their differentiated offspring by a stably integrated calcium indicator protein. *Cell Signal* **2013**, *25*, 752-9.10.1016/j.celsig.2012.12.024
83. Erdei, Z.; Schamberger, A.; Torok, G.; Szebenyi, K.; Varady, G.; Orban, T. I.; Homolya, L.; Sarkadi, B.; Apati, A. Generation of multidrug resistant human tissues by overexpression of the ABCG2 multidrug transporter in embryonic stem cells. *PLoS One* **2018**, *13*, e0194925.10.1371/journal.pone.0194925
84. Orban, T. I.; Apati, A.; Nemeth, A.; Varga, N.; Krizsik, V.; Schamberger, A.; Szebenyi, K.; Erdei, Z.; Varady, G.; Karaszi, E.; Homolya, L.; Nemet, K.; Gocza, E.; Miskey, C.; Mates, L.; Ivics, Z.; Izsvak, Z.; Sarkadi, B. Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells* **2009**, *27*, 1077-87.10.1002/stem.45
85. Szebenyi, K.; Pentek, A.; Erdei, Z.; Varady, G.; Orban, T. I.; Sarkadi, B.; Apati, A. Efficient generation of human embryonic stem cell-derived cardiac progenitors based on tissue-specific enhanced green fluorescence protein expression. *Tissue Eng Part C Methods* **2015**, *21*, 35-45.10.1089/ten.TEC.2013.0646
86. Vofely, G.; Berecz, T.; Szabo, E.; Szebenyi, K.; Hathy, E.; Orban, T. I.; Sarkadi, B.; Homolya, L.; Marchetto, M. C.; Rethelyi, J. M.; Apati, A. Characterization of calcium signals in human induced pluripotent stem cell-derived dentate gyrus neuronal progenitors and mature neurons, stably expressing an advanced calcium indicator protein. *Mol Cell Neurosci* **2018**, *88*, 222-230.10.1016/j.mcn.2018.02.003
87. Ree, D.; Borsy, A.; Fothi, A.; Orban, T. I.; Varady, G.; Erdei, Z.; Sarkadi, B.; Rethelyi, J.; Varga, N.; Apati, A. Establishing a human embryonic stem cell clone with a heterozygous mutation in the DGCR8 gene. *Stem Cell Res* **2020**, *50*, 102134.10.1016/j.scr.2020.102134
88. Ree, D.; Fothi, A.; Varga, N.; Kolacsek, O.; Orban, T. I.; Apati, A. Partial Disturbance of Microprocessor Function in Human Stem Cells Carrying a Heterozygous Mutation in the DGCR8 Gene. *Genes (Basel)* **2022**, *13*.10.3390/genes13111925
89. Hathy, E.; Szabo, E.; Varga, N.; Erdei, Z.; Tordai, C.; Czehlar, B.; Baradits, M.; Jezso, B.; Koller, J.; Nagy, L.; Molnar, M. J.; Homolya, L.; Nemoda, Z.; Apati, A.; Rethelyi, J. M. Investigation of de novo mutations in a schizophrenia case-parent trio by induced pluripotent stem cell-based in vitro disease modeling: convergence of schizophrenia- and autism-related cellular phenotypes. *Stem Cell Res Ther* **2020**, *11*, 504.10.1186/s13287-020-01980-5
90. Hathy, E.; Szabo, E.; Vincze, K.; Haltrich, I.; Kiss, E.; Varga, N.; Erdei, Z.; Varady, G.; Homolya, L.; Apati, A.; Rethelyi, J. M. Generation of multiple iPSC clones from a male schizophrenia patient carrying de novo mutations in genes KHSRP, LRRC7, and KIR2DL1, and his parents. *Stem Cell Res* **2021**, *51*, 102140.10.1016/j.scr.2020.102140
91. Szabo, E.; Juhasz, F.; Homolya, L.; Erdei, Z.; Apati, A. Generation of Human Neural Progenitors from Blood Samples by Interrupted Reprogramming. *Methods Mol Biol* **2022**, *2454*, 241-255.10.1007/978107192021_386
92. Szabo, E.; Ree, D.; Jezso, B.; Vincze, K.; Foldes, G.; Molnar, A. A.; Rethelyi, J. M.; Apati, A. Generation of iPSC lines from peripheral blood mononuclear cells of identical twins both suffering from type 2 diabetes mellitus and one of them additionally diagnosed with atherosclerosis. *Stem Cell Res* **2020**, *49*, 102051.10.1016/j.scr.2020.102051
93. Chen, K. G.; Mallon, B. S.; Park, K.; Robey, P. G.; McKay, R. D. G.; Gottesman, M. M.; Zheng, W. Pluripotent Stem Cell Platforms for Drug Discovery. *Trends Mol Med* **2018**, *24*, 805-820.10.1016/j.molmed.2018.06.009
94. Yellamilli, A.; van Berlo, J. H. The Role of Cardiac Side Population Cells in Cardiac Regeneration. *Front Cell Dev Biol* **2016**, *4*, 102.10.3389/fcell.2016.00102
95. Koudstaal, S.; Jansen Of Lorkeers, S. J.; Gaetani, R.; Gho, J. M.; van Slochteren, F. J.; Sluijter, J. P.; Doevendans, P. A.; Ellison, G. M.; Chamuleau, S. A. Concise review: heart regeneration and the role of cardiac stem cells. *Stem Cells Transl Med* **2013**, *2*, 434-43.10.5966/sctm.2013-0001
96. Malmersjo, S.; Liste, I.; Dyachok, O.; Tengholm, A.; Arenas, E.; Uhlen, P. Ca²⁺ and cAMP signaling in human embryonic stem cell-derived dopamine neurons. *Stem Cells Dev* **2010**, *19*, 1355-64.10.1089/scd.2009.0436

97. Putney, J. W. Forms and functions of store-operated calcium entry mediators, STIM and Orai. *Adv Biol Regul* **2018**, *68*, 88-96.10.1016/j.jbior.2017.11.006
98. Ermakov, A.; Daks, A.; Fedorova, O.; Shuvalov, O.; Barlev, N. A. Ca(2+) -depended signaling pathways regulate self-renewal and pluripotency of stem cells. *Cell Biol Int* **2018**, *42*, 1086-1096.10.1002/cbin.10998
99. Lucassen, P. J.; Toni, N.; Kempermann, G.; Frisen, J.; Gage, F. H.; Swaab, D. F. Limits to human neurogenesis-really?, *Mol Psychiatry* **2020**, *25*, 2207-2209.10.1038/s41380-018-0337-5
100. Anand, K. S.; Dhikav, V. Hippocampus in health and disease: An overview. *Ann Indian Acad Neurol* **2012**, *15*, 239-46.10.4103/0972-2327.104323
101. Fritsche, E.; Haarmann-Stemmann, T.; Kapr, J.; Galanjuk, S.; Hartmann, J.; Mertens, P. R.; Kampfer, A. A. M.; Schins, R. P. F.; Tigges, J.; Koch, K. Stem Cells for Next Level Toxicity Testing in the 21st Century. *Small* **2021**, *17*, e2006252.10.1002/smll.202006252
102. Galiakberova, A. A.; Surin, A. M.; Bakaeva, Z. V.; Sharipov, R. R.; Zhang, D.; Dorovskoy, D. A.; Shakirova, K. M.; Fisenko, A. P.; Dashinimaev, E. B. iPSC-Derived Human Neurons with GCaMP6s Expression Allow In Vitro Study of Neurophysiological Responses to Neurochemicals. *Neurochem Res* **2022**, *47*, 952-966.10.1007/s11064-021-03497-6
103. Lidgerwood, G. E.; Pitson, S. M.; Bonder, C.; Pebay, A. Roles of lysophosphatidic acid and sphingosine-1-phosphate in stem cell biology. *Prog Lipid Res* **2018**, *72*, 42-54.10.1016/j.plipres.2018.09.001
104. Bacsikai, I.; Mazlo, A.; Kis-Toth, K.; Szabo, A.; Panyi, G.; Sarkadi, B.; Apati, A.; Rajnavolgyi, E. Mesenchymal Stromal Cell-Like Cells Set the Balance of Stimulatory and Inhibitory Signals in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev* **2015**, *24*, 1805-16.10.1089/scd.2014.0509
105. Paloczi, J.; Varga, Z. V.; Apati, A.; Szebenyi, K.; Sarkadi, B.; Madonna, R.; De Caterina, R.; Csont, T.; Eschenhagen, T.; Ferdinandy, P.; Gorbe, A. Exogenous Nitric Oxide Protects Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiomyocytes against Ischemia/Reperfusion Injury. *Oxid Med Cell Longev* **2016**, *2016*, 4298945.10.1155/2016/4298945
106. Lilienberg, J.; Hegyi, Z.; Szabo, E.; Hathy, E.; Malnasi-Csizmadia, A.; Rethelyi, J. M.; Apati, A.; Homolya, L. Pharmacological Modulation of Neurite Outgrowth in Human Neural Progenitor Cells by Inhibiting Non-muscle Myosin II. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 719636.10.3389/fcell.2021.719636
107. Szabo, E.; Juhasz, F.; Hathy, E.; Ree, D.; Homolya, L.; Erdei, Z.; Rethelyi, J. M.; Apati, A. Functional Comparison of Blood-Derived Human Neural Progenitor Cells. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*.10.3390/ijms21239118
108. Erdelyi-Belle, B.; Torok, G.; Apati, A.; Sarkadi, B.; Schaff, Z.; Kiss, A.; Homolya, L. Expression of Tight Junction Components in Hepatocyte-Like Cells Differentiated from Human Embryonic Stem Cells. *Pathol Oncol Res* **2015**, *21*, 1059-70.10.1007/s12253-015-9936-5
109. Torok, G.; Erdei, Z.; Lilienberg, J.; Apati, A.; Homolya, L. The importance of transporters and cell polarization for the evaluation of human stem cell-derived hepatic cells. *PLoS One* **2020**, *15*, e0227751.10.1371/journal.pone.0227751
110. Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, F.; Krause, D.; Deans, R.; Keating, A.; Prockop, D.; Horwitz, E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **2006**, *8*, 315-7.10.1080/14653240600855905
111. Hoogduijn, M. J.; Popp, F.; Verbeek, R.; Masoodi, M.; Nicolaou, A.; Baan, C.; Dahlke, M. H. The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells and their use for immunotherapy. *Int Immunopharmacol* **2010**, *10*, 1496-500.10.1016/j.intimp.2010.06.019
112. Le Blanc, K.; Tammik, L.; Sundberg, B.; Haynesworth, S. E.; Ringden, O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol* **2003**, *57*, 11-20.10.1046/j.1365-3083.2003.01176.x