

**Alternatív *in vitro* módszerek kidolgozása:
Emberi embrionális őssejt vonalak alkalmazása születés előtti toxicitás kimutatására**

PhD tézis rövid összefoglaló

Vojnits Kinga MSc

Systems Toxicology Unit, Institute for Health and Consumer Protection,
European Commission Joint Research Centre, Ispra, Italy

Biokémia Intézet, Általános orvostudományi Kar
Szegedi Tudományegyetem, Szeged

2011

Az embrionális fejlődés fázisában az idegrendszer gyakran válik xenobiotikumok, a szervezettől idegen kémiai anyagok célpontjává. Ugyanakkor az emberi születést megelőző toxicitás előrejelzése nem egyszerű feladat, mivel a toxikológiai válasz még a különböző laboratóriumi kísérleti állatfajok között is eltérő lehet. Ezért a fejlődés-toxikológia terén olyan tesztek kifejlesztésére van szükség, amelyek lehetővé teszik a fajok közötti különbségek okozta problémák kiküszöbölését, javítva az emberi egészség e pontjával kapcsolatos biztonságossági értékelés lehetőségét. Az emberi pluripotens őssejtek alkalmazásán alapuló *in vitro* tesztek amellest, hogy rávilágíthatnak toxikológiai mechanizmusokra - így elősegítve a xenobiotikumok veszélyességének megítélését, - egyben csökkentik a szükséges állatkísérletek számát is, ami a területtel kapcsolatos európai törvényhozás egyik fő céljaként fogalmazódott meg mostanában.

Emberi embrionális őssejt (hESC) vonalak izolálása vagy a szederacsírából (morula), vagy a hólyagcsíra (blastocisza) állapotú embrió belső sejtömegéből történik az egyedfejlődés 5.-6. napján. Ezek a sejtek - komoly etikai megfontolásokat követően - alkalmazhatóak gyógyszerfejlesztési célokra kihasználva két különleges képességüket: a készséget arra, hogy osztódás útján önmagukkal megegyező másolatokat állítsanak elő, vagyis az ön-megújítást, valamint azt a potenciált, hogy más sejt-formákká differenciálódjanak. A más, *in vitro* toxicitás tesztekben alkalmazott sejtvonalakhoz képest mutatott átütő előnyeik közé sorolható viszonylag magas stabilitásuk, kontrollált genetikai hátterük, irányítható genetikai módosíthatóságuk, korlátlan proliferációs készségük, és a változatos sejtípusokká való differenciálódási potenciáljuk. Ez utóbbi révén gyorsan rendelkezésre álló forrásai lehetnek emberi szomatikus sejteknek, ígéretes és gyors alternatívát nyújtva nagyszámú sejtömeg szüksége esetén. Mindezekén túl az őssejt technológia új eszközt kínál a gyógyszerek okozta nemkívánatos reakciókban szerepet játszó mechanizmusok megértéséhez is, lehetővé téve az emberi szervezetre gyakorolt esetleges toxikus hatások előrejelzését.

E dolgozat egy olyan hESC alkalmazáson alapuló tesztrendszerrel mutat be, amelynek célja, hogy hozzájáruljon a fejlődő idegrendszerre gyakorolt káros hatások detektálásához, mint amilyen például az idegcső hibás fejlődése, mely az egyik leggyakoribb születéskori idegrendszeri rendellenesség. A disszertáció egy olyan emberi őssejt alapú *in vitro* teszt kifejlesztését írja le részletesen, amelynek célja a fejlődő idegrendszerrel kölcsönható vegyületek azonosítása. Munkánk során különös figyelmet fordítottunk sejtvonalra vonatkozó minőségi standardok kialakítására és a sejtes modellek elfogadási kritériumainak teljesítésére,

melyeket az illetékes hatóságok a szabályozás kialakításakor a biztonságossági értékelésben alkalmazott toxikológiai tesztek esetében igényelnek.

Az irodalomban fellelhető számos protokoll közül, melyek neuronális sejtípusú történő sikeres differenciálódásról számolnak be, azt a módszert választottuk és optimalizáltunk, amely alkalmasnak bizonyult időben stabil módon megfelelően nagyszámú toxikológiai célsejt előállítására. A differenciációs protokoll reprodukálhatóságát egy mindhárom csíralemezt reprezentáló markergén-készlet segítségével követtük kvantitatív PCR (qPCR), immunfluoreszcencia és flow citometriás analízis segítségével. A differenciációt sikeresnek tekintettük, amennyiben a pluripotens sejtek jellemzőjeként számon tartott *OCT4* és *NANOG* differenciálatlan sejt marker downregulációját tapasztaltuk, és emellett az idő előrehaladtával következetes módon megjelenő overexpressziót detektáltunk ismert idegrendszerre jellemző gének esetén, mint a *NESTIN*, *PAX6*, *MAP2*, *NCAM1*, *NEFM* és az *OTX2*. A differenciációs protokoll többszöri megismétlése lehetővé tette az adatok összehasonlítását megengedő szűk tartomány definiálását a génexpressziós szintek (ΔC_t értékek) számára. Összefoglalva, a megbízható irodalmi forrásból származó modellt az emberi idegrendszer kialakulásának lépéseit követve és időablakát figyelembe véve robusztus és megbízható *in vitro* teszt módszerré alakítottuk.

A sejtes modell kémiai stresszhatásra való válaszána vizsgálata céljából a sejteket hat különböző toxikus anyag hatásának tettük ki, melyeket korábban az embrionális fejlődésre hatónak találtak *in vivo*. Választott molekuláink az 5-fluorouracil, 6-aminonikotinamid, methotrexate, retinolsav, valproinsav és a warfarin voltak. Negatív kontrollként D-mannitolt alkalmaztunk. Az idegsejt-differenciálódásra gyakorolt specifikus hatások elemzését megelőzően meghatároztuk a hatékony koncentráció tartományt abból a célból, hogy elkerüljük az értékelést a citotoxikus koncentráció tartományban, hiszen a citotoxikus hatás torzíthatja, vagy elfedheti a vizsgálni kívánt gén-expressziós profilt. A neurális differenciálódás 10 napját követően a kiválasztott anyagok jelenlétében az egyes anyagok citotoxicitását a resazurin redukciós módszerrel határoztuk meg. A D-mannitolon és methotrexaton kívül öt anyag mutatott koncentráció függő resazurin redukció gátlást a differenciálódó neurális prekursor sejtekben. Mivel az alkalmazott citotoxicitás teszt nem nyújt információt az idegrendszeri prekursor sejtekre gyakorolt specifikus hatásokról, az egyes vegyületek okozta változást a kiválasztott, neurális prekursor marker gén készlet qPCR analízisével is jellemeztük. Az mRNS expressziós szint profilokban bekövetkezett mennyiségi változások bizonyították sejtes modellünk alkalmasságát a fejlődő magzatot fenyegető veszélyes anyagok azonosításában.

Ezen felül, a toxikus anyagok hatásmechanizmusának megértéséhez hozzájárulva referencia vegyületként vizsgáltunk egy környezetszennyező toxikus anyagot, a metil higany-kloridot (MeHgCl), amely ismertén felelős agyszerkezeti fejlődéstani rendellenességek okozásáért. Annak ellenére, hogy jelentős mennyiségű adat áll rendelkezésre állatkísérletekből és Japánban illetve Irakban bekövetkezett mérgezéses esetekből, a MeHgCl hatásmechanizmusa az emberi egyedfejlődés során még mindig nem teljesen tisztázott és további elemzésre érdemes.

MeHgCl-t alkalmazva 10 napon keresztül a neuronális prekursorsejtek differenciációja során, 0,27 μ M – 3,3 nM koncentráció-tartományban az idegrendszeri differenciációval összefüggő gének, mint a *MAP2*, *NCAM1* és *NESTIN* jelentős, koncentráció függő downregulációját tapasztaltuk, míg a pluripotencia marker *OCT4* upregulálódott a qPCR tanúsága szerint. Eredményeink arra utalnak, hogy a MeHgCl a közönséges citotoxicitástól eltérő mechanizmus révén zavarja a korai idegrendszeri differenciálódást, az egyszerű sejthalálnál specifikusabb hatást fejtve ki a fejlődő idegrendszeri sejtekre.

A jellemző hatásmód felderítése érdekében transzkriptomikai analízissel elemeztük az expressziós változásokat a MeHgCl jelenlétében 10 napos idegrendszeri differenciálódáson átesett hESC-k teljes genomján. A MeHgCl kezelés hatására megváltozott mértékben kifejezett gének közül a leginkább upregulált transzkriptek közé olyan gének tartoztak, amelyek a neurogenesisért, idegsejt fejlődésért, idegsejtté történő differenciálódásban résztvevő morfogenezisért, neuron- és más sejtvándorlásért, a központi idegrendszer, az agy, az agykéreg (pallium) és az előagy fejlődésért felelősek. A leginkább downregulálódott gének a vérerek, az érrendszer, szív, bőr, tüdő és vese fejlődéséért, a dúlcél sejtek fejlődésért és differenciálódásáért, valamint az idegcső keletkezésért és záródásáért felelősek. Ezenfelül olyan, - *in vivo* kísérleti eredményekkel figyelemre méltó összefüggést mutató - , MeHgCl által érintett mechanizmusokat azonosítottunk, mint a kalcium jelátviteli útvonal, sejtdhéziós molekulák, sejtciklus, daganatos betegségekben érintett jelátvitel, p53 és Wnt signaling útvonalak. A két leginkább upregulált illetve downregulált gén, *RELN*, *NPPB*, *CDKN2B*, és *SAMD3* további vizsgálata megerősítette a MeHgCl koncentrációfüggő hatását a neurális differenciálódás alatt álló hESC sejteken.

Összegezve a MeHgCl kezelés módosította a neurális differenciálódás alatt álló hESC sejtek sejtciklusát a cyclin D1 stimulálásával a *RELN* magas expressziós szintje révén és a CDK4/6 inhibitor *CDKN2B* gátlása következtében, a poly-comb fehérjék közé tartozó PRC1/2 vagy a TGF β útvonalon keresztül. Ez a sejtek állandó sejtciklusba való belépését okozta, megakadályozva ezzel a neurális prekursor sejtek további érését és differenciálódását.

Általánosságban elmondhatjuk, hogy vizsgálataink igazolták, hogy jól leírt standard eljárások és szigorú minőségi szabványok bevezetése támogathat minket a differenciációs protokollok instabilitása révén előrelátható kihívások legyőzésében. E munkában egy olyan összejtes modell kifejlesztését írtuk le, amely alapjául szolgálhat emberi fejlődési rendellenességeket okozó toxikus anyagok azonosítására alkalmas prediktív *in vitro* eljárásoknak. Tudomásunk szerint az itt közölt kísérletsorozat az első olyan munka, amely neurálisan differenciálódó hECS sejteket kombinált “omics” technikával abból a célból, hogy fényt derítsen a MeHgCl hatásmechanizmusára. Miután sejtes rendszerünket megfelelően érzékenynek találtuk az mRNS szinteknek qPCR-rel még alacsony MeHgCl koncentrációknál is mérhető változásai alapján, a sejteket további transzkriptomikai elemzésnek vetettük alá. Azonosítottunk továbbá olyan lehetséges biomarkereket, amelyek a MeHgCl toxicitásnak a neuronális prekursor indukcióval való összefüggésére utalnak. Elsőként találtunk összefüggést a MeHgCl emberi idegrendszer fejlődésére gyakorolt *in vitro* mérhető molekuláris hatásai, melyek az *RELN* upregulációjához és *CDKN2B* downregulációjához köthetők és az *in vivo* tapasztalt hatások között, mint a neurális migráció és sejt ciklus zavarai.

A TÉZISHEZ KAPCSOLÓDÓ KÖZLEMÉNYEK

- I. **Vojnits K** and Bremer S: Challenges of using pluripotent stem cells for safety assessments of substances. *Toxicology* 270(1):10-7. (2010). IF: 3.64
- II. Glavinas H, von Richter O, **Vojnits K**, Mehn D, Wilhelm I, Nagy T, Janossy J, Krizbai I, Couraud P, Krajcsi P.: Calcein assay: a high-throughput method to assess P-gp inhibition. *Xenobiotica* 41(8):712-9. (2011). IF: 2.707
- III. Klaric M, Ensenat-Waser R, **Vojnits K** and Bremer-Hoffmann S: Frontiers in pluripotent stem cells research and therapeutic potential. Chapter 19: Stem cell technologies and their application in modern toxicology – current state of the art. In press.
- IV. **Vojnits K**, Ensenat-Waser R, Gaspar JA, Meganathan K, Jagtap S, Hescheler J, Sachinidis A and Bremer S: A transcriptomics study to elucidate the toxicological mechanism of methylmercury chloride in a human stem cell based *in vitro* test. *Current Medicinal Chemistry*. In press.

- V. Klaric M, Winkler J, **Vojnits K**, Meganathan K, Jagtap S, Ensenat-Waser R, Hescheler J, Sachinidis A and Bremer-Hoffmann S: Current status of human pluripotent stem cell based *in vitro* toxicity. Frontiers of Bioscience Landmark. In press.
- VI. Vojnits K, Ensenat-Waser R, Klaric M and Bremer S: Human pluripotent stem cells as a tool to support the understanding of human developmental toxicity. Stem Cells. Submitted.
- VII. Nerini-Molteni S, Mennecozzi M, Sacco MG, **Vojnits K**, Fabbri M, Gribaldo L, Whelan M and Bremer S: microRNA expression analysis and developmental toxicity: a new tool for pathway identification? Current Medicinal Chemistry. Submitted.