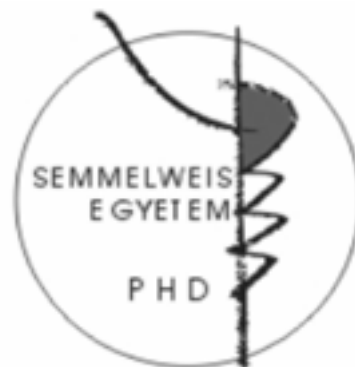


Új módszer az emberi pluripotens őssejtekből létrehozható szívizom- és szívprogenitor sejtek kiválogatására

Doktori tézisek

Szebényi Kornélia

Semmelweis Egyetem
Molekuláris Orvostudományi Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Sarkadi Balázs egyetemi tanár, az MTA tagja

Tudományos tanácsadó: Dr. Apáti Ágota tudományos munkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Földes Gábor egyetemi oktató, Ph.D.

Dr. Pirty Melinda tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Szigorlati Bizottság elnöke: Dr. Ligeti Erzsébet egyetemi tanár, az MTA tagja

Szigorlati Bizottság tagjai: Dr. Sipeki Szabolcs egyetemi adjunktus, Ph.D.

Dr. Hiripi László tudományos munkatárs, Ph.D.

Budapest
2014

Bevezetés

Az őssejtek korlátlan számú sejtosztódásra, ezáltal korlátlan önmegújulásra képes specializálatlan sejtek, amelyek megfelelő (fiziológias vagy laboratóriumi) körülmények között szövetspecifikus sejtekké differenciálódnak.

A humán embrionális őssejt vonalak blasztociszta állapotú embriók belső sejtcsomójából létrehozott sejtvonalak, amelyek bármely testi sejt kimeríthetetlen forrásul szolgálhatnak korlátlan önmegújulási és differenciációs képességüknek (pluripotencia) köszönhetően. Annak érdekében, hogy a differenciálódott utódsejtek gyógyszerek tesztelésére alkalmas rendszerek vagy terápiás alkalmazások alapjául szolgálhassanak olyan módszerekre van szükség, amelyek lehetővé teszik a célsejtek nagy mennyiségben és nagy tisztaságban történő előállítását. Az előállítani kívánt sejtípus mennyisége növelhető a célsejt differenciációs tenyészetben belüli feldúsításával (irányított differenciációs protokollok alkalmazása), míg a sejtpreparátumok tisztasága a célsejtek differenciációs tenyészetből történő kiválogatásával javítható. Ezért szükséges az olyan módszerek kidolgozása, amelyek lehetővé teszik a különböző típusú sejtek egymástól való megkülönböztetését, és ezáltal a különböző célsejtek kiválogatását.

Élő sejteket kiválogatni genetikailag módosított tulajdonságok vagy a sejt felszínén megtalálható fehérjék alapján lehet. Genetikailag módosított tulajdonságokra leginkább akkor van szükség, ha a célsejtre jellemző ismert fehérjék nem a sejt felszínén találhatók, ezáltal kimutatásukhoz a sejt membránjának roncsolására van szükség.

A szívizomsejtek esetében is csak a közelmúltban sikeresült azonosítani olyan sejt felszíni fehérjéket (SIRPA, VCAM1 és ALCAM), amelyek a szívizomsejtekre jellemző transzkripciós faktorokkal (*ISLI*, *TBX5*, *NKX2.5* és *GATA4*) és szarkomer fehérjékkel (troponin I és T) egyszerre fejeződnek ki.

Egy másik lehetőség a szívizomsejtek mennyiségének növelésére egy többlépéses folyamat, melynek során először a szívizomsejtek előalakjait, az úgynevezett progenitor sejteket válogatják ki a differenciációs tenyészetből. A progenitor sejtek – ellentétben a teljesen specializálódott szívizomsejtekkel - még képesek osztódni, így differenciálódásuk átmeneti felfüggesztésével növelhető a mennyiségük. A differenciáció folytatásával a felszaporított progenitor sejtekből szívizomsejtek állíthatók elő. Az így előállított szívizomsejt preparátum tisztasága azonban nagy mértékben függ attól, hogy a differenciáció mely stádiumában lévő progenitor sejteket (kardiogén mezoderma-jellegű, kardiovaszkuláris, szívizom progenitor) válogatnak ki, hiszen minél éretlenebb egy progenitor sejt, annál többféle sejtípus keletkezhet belőle. Ezért olyan progenitor sejtípus kiválogatása volt a célunk, amely amellett, hogy képes osztódni, kellően nagy tisztaságú szívizomsejt preparátum előállítását teszi lehetővé.

Célkitűzés

A disszertációban bemutatott kutatómunka célja egy olyan új in vitro módszer létrehozása volt, ami lehetővé teszi a humán embrionális őssejtekből differenciálódó szívizomsejtek és azok előalakjai, a szívizom progenitor sejtek kiválogatását. A kitűzött cél elérése érdekében szükséges volt:

1. bizonyítani, hogy a CAG promoter lehetővé teszi a szívizomsejtek azonosítását spontán módon differenciálódó őssejt tenyészetekben
2. a humán embrionális őssejtek szívizom irányú differenciációjának elősegítésére alkalmas differenciáltatási módszer beállításával a szívizom progenitor sejtek tenyészetben való feldúsulását előidézni
3. bizonyítani, hogy a CAG promoter lehetővé teszi a szívizom progenitor sejtek azonosítását és kiválogatását irányítottan differenciálódó őssejt tenyészetekben
4. beállítani azt az ideális tenyésztési körülményt, amely leginkább támogatja a kiválogatott szívizom progenitor sejtek szívizom irányba történő differenciációját
5. bizonyítani, hogy a differenciálódó humán embrionális őssejt tenyészetből kiválogatott szívizom progenitorokból szívizomban tiszta tenyészetek állíthatók elő
6. a kiválogatott szívizom progenitor sejtek aggregációs és túlélési képességeit elősegítő tenyésztési körülményt beállítani és ezáltal a kinyerhető szívizomsejt mennyiségét növelni

Módszerek

Humán embrionális őssejtek tenyésztése és differenciáltatása

Az eredeti HUES9 humán embrionális őssejt vonalat Dr. Douglas Meltontól, a Harvard Egyetem professzorától kaptuk egy nemzetközi együttműködés keretében, míg a BG01V őssejtvonalat az ATCC-től szereztük be.

A HUES9 és a BG01V sejtvonalak genetikai módosításakor a CAG promótert és az irányítása alatt kifejezni kívánt EGFP fluoreszcens fehérjét kódoló cDNS-t tartalmazó plazmidot (CAG-EGFP konstrukció) *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli módszerrel jutattuk a sejtekbe. A CAG promóter általunk használt verziója egy CMV enhanszer régióból, két csirke β -aktin promóter szekvenciából és egy rövid nyúl β 1-globin promóter szekvenciából áll.

A HUES9-CAG-EGFP és BG01V-CAG-EGFP humán embrionális őssejtvonalakat mitomycin C-vel mitotikusan gátolt egér embrionális fibroblaszt sejteken tenyésztettük. A spontán differenciáció megindításához az őssejtekből embrioid testecskéket (EB) képeztünk szuszpenziós tenyésztési körülmények között, borjúsérum jelenlétében, majd 6 nap után az EB-eket kiültettük egy zselatinnal bevont felületre (adherens tenyészet). Az irányított differenciáció során a borjúsérum helyett a differenciációs szignálokat meghatározott sorrendben adagolt növekedési faktorok biztosították.

Sejtek mérése áramlási citométerrel

A differenciálatlan HUES9-CAG-EGFP kolóniákat az egér embrionális fibroblaszt sejtrétegtől enzimatis emésztés segítségével választottuk le. Ehhez 0,05%-os trypsin-EDTA oldatot használtunk, míg a HUES9-CAG-EGFP aggregátumokból 0,25%-os trypsin-EDTA-val tudunk egysejtes szuszpenziót létrehozni. A mérés előkészítése során 0,5% borjúsérum albumint (BSA) tartalmazó PBS oldatban jelöltük a sejteket. A direkt jelölt monoklonális antitestekkel 30 percen keresztül, 37 °C-os hőmérsékleten inkubáltuk a sejteket. Intracelluláris jelölés esetén a sejteket 4%-os paraformaldehiddel (PFA) fixáltuk és permeabilizáltuk az indirekt ellenanyaggal való jelölés előtt. A jelölés 2% BSA és 0,75% Saponin (Saponin) jelenléte mellett, PBS-ben történt. A megfelelő izotípus- vagy másodlagos kontrollok fluoreszcenciáját meghaladó jelintenzitásokat tekintettük csak pozitív festődésnek. A halott sejteket 7AAD (Sigma) jelölés segítségével különítettük el és az analízis során nem vettük figyelembe. A minták analizálását a FACSCalibur áramlási citométerrel (Beckton-Dickinson, San Jose, CA) és a BD CellQuest programmal, vagy a FACS Aria High Speed Cell Sorterrel (Beckton-Dickinson, San Jose, CA) és BD FACSDiva programmal végeztük.

Sejtek kiválogatása áramlási citométerrel

Miután enzimatis emésztéssel egysejtes szuszpenziót hoztunk létre a transzgenikus őssejtcsomókból, a sejteket áramlási citométer segítségével különböző, az EGFP intenzitásuk alapján meghatározott frakciókba (gyenge, közepes és erős) gyűjtöttük. Ennek az úgynevezett szortolási eljárásnak a pontosságát, azaz a szortolt sejtfrakciók tisztaságát az adott populációk EGFP jelintenzitásának detektálásával ellenőriztük, közvetlenül a szortolást követően. A különböző frakciókba gyűjtött sejteket vagy továbbtenyésztettük, vagy TRIzol™ Reagensben (Invitrogen) tároltuk a génexpressziós vizsgálatok elvégzéséig.

Fluoreszcens detektálás

A fluoreszcens plate olvasó rendszerrel végzett méréseket a kiválogatott sejtekből létrehozott aggregátumok tenyésztésének 3. és 20. napján végeztük a VICTORX3 2030 Multilabel Reader (Perkin Elmer) mérőkészülék segítségével. Az EGFP jel detektálása érdekében 490 nm-es gerjesztést és az F535 emissziós filtert használtuk. A propidium jodid (PI) jelölés előtt az aggregátumokat metanollal jégen fixáltuk 15 percig. A PI-vel való inkubálás után az aggregátumokat friss PBS-ben ültettük ki 96 lyukú tenyésztőedényekbe. Az PI jel detektálása érdekében 540 nm-es gerjesztést és az F660 emissziós filtert használtuk.

Immunhisztokémiai vizsgálatok

Immunfestéskor az EB-eket és az aggregátumokat 4%-os paraformaldehiddel szobahőmérsékleten 15 percen keresztül fixáltuk. Egy DPBS mosási lépés után, a nem-specifikus antitest kötődést 1 órán keresztül szobahőmérsékleten blokkoltuk egy olyan oldattal, amely 2mg/ml BSA-t, 1% halzselatint, 5% kecskeszérumot és 0,1% Triton-X 100-at tartalmazott. A mintákat mind az elsődleges, mind a másodlagos antitestekkel 1-1 órán keresztül szobahőmérsékleten inkubáltuk. A magfestésekhez DAPI-t (Invitrogen, Madison, WI) használtunk. A mintákat vagy az Olympus FV500-IX konfokális mikroszkóppal, vagy egy fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

Valós-idejű kvantitatív PCR analízis

A TRIzol™ Reagensben (Invitrogen) elvett sejtekből a gyártó előírásainak megfelelő módon izoláltunk teljes RNS-t. A cDNS-t 0,2 µg teljes RNS-ből írtuk át a Promega Reverse Transcription System Kit segítségével. A valós-idejű kvantitatív PCR (QPCR) analízishez az Applied Biosystems Pre-Developed TaqMan® esszéjét használtuk, és az analízist a StepOne™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems) műszerrel végeztük. A génexpressziós eredményeket a $2^{-\Delta\Delta Ct}$ módszerrel, a P0 belső kontroll génre vonatkoztatva adtuk meg. A relatív mRNS szintek három független kísérlet eredményeinek átlagát (\pm S.E.M.) mutatják.

Eredmények

1. A CAG promóter lehetővé teszi differenciálódó humán embrionális őssejt tenyészetekben a szívizomsejtek azonosítását

Az EGFP fluoreszcens fehérjét kifejező HUES9 és BG01V humán embrionális őssejtek létrehozásakor a CAG-EGFP konstrukciót a *Sleeping Beauty* transzpozon alapú génbeviteli módszerrel jutattuk a sejtekbe. A transzgenikus humán embrionális őssejtvonalakat (HUES9-CAG-EGFP és BG01V-CAG-EGFP) az EGFP-t kifejező őssejtek feldúsításával hoztuk létre. Ezek az őssejt vonalak hosszas laboratóriumi tenyésztés során is megőrizték pluripotenciáljukat, spontán differenciációjuk során mindhárom csíralemezre jellemző sejtek keletkeztek. A szívizomsejtek keletkezését spontán kontrakciót mutató területek megjelenése jelezte a differenciáció során. A spontán kontrakciót mutató területek esetében különösen magas EGFP expresszió volt megfigyelhető, míg a differenciációs tenyészetekben megtalálható más típusú sejtek alacsonyabb EGFP jelintenzitást mutattak. Ez a szívizomspecifikus erős EGFP expresszió az általunk használt CAG promóter (az eredeti konstitutív CAG promóter módosított verziója) különleges tulajdonságából fakad, ami lehetővé teszi a szívizomsejtek EGFP expresszió-alapú detektálását és kiválogatását. A CAG promóterre épülő rendszer "kettős arcú" rendszer, mivel lehetővé teszi mind a transzgént expresszáló őssejtek, mind az azokból differenciálódó szívizomsejtek felismerését és kiválogatását.

2. A CAG-EGFP-t kifejező humán embrionális őssejtek kardiogén mezoderma irányú irányított differenciáltatása

Annak kimutatása érdekében, hogy a CAG promóter lehetővé teszi szívizom progenitorok azonosítását is, a spontán differenciáció helyett egy irányított differenciációs protokoll alkalmazására volt szükség, ami a differenciációs tenyészetekben a mezoderma eredetű sejtek feldúsulásához vezetett. Az alkalmazott protokollt az irodalomból vettük át és módosítottuk annak érdekében, hogy az általunk előállított transzgenikus őssejtvonalak esetében is hatékonyan működjön. Az irányított differenciáció szinkronizálta a sejtek differenciációjának az időbeli lefutását és fel is gyorsította azt. Az áramlási citometriás összehasonlító vizsgálataink alapján elmondható, hogy a spontán differenciációhoz képest az irányított differenciáció hatására az őssejtek nagyobb arányban választották a mezoderma irányú elköteleződést. A nagyobb mennyiségben keletkező spontán kontrakciót mutató területek (és a nagyobb arányú troponin I expresszió) is az irányított differenciáció hatékony működését igazolták.

3. A CAG promóter lehetővé teszi szívizom progenitor sejtek azonosítását és kiválogatását differenciálódó humán embrionális őssejt tenyészetekből

Annak bizonyítása érdekében, hogy a CAG-EGFP jelintenzitásbeli különbségek lehetővé teszik szívizom progenitorok azonosítását és kiválogatását, áramlási citométer segítségével szétválogattuk a differenciálódó HUES9-CAG-EGFP tenyészet sejtjeit és a kiválogatott sejtpopulációk transzkripciós profilját QPCR módszer segítségével ellenőriztük. Kiderült, hogy a legerősebb EGFP jelintenzitású frakcióban (CAG-EGFP^{erős}) a szívizomspecifikus gének expressziója jelentősen meghaladta az alacsony EGFP jelintenzitást mutató frakció (CAG-EGFP^{gyenge}) expressziós szintjeit, míg a korai ekto- és endodermális gének expressziója jellemzően a CAG-EGFP^{gyenge} mintákban volt magasabb. Kivételt képezett a korai szívizom állapotra jellemző *NKX2.5* transzkripciós faktor, aminek az mRNA expressziója szignifikánsan alacsonyabb volt a CAG-EGFP^{erős} frakciókban, mint a CAG-EGFP^{gyenge} mintákban

Annak érdekében, hogy a CAG-EGFP^{erős} progenitor sejtek érettségi (elköteleződési) fokát azonosíthassuk, megvizsgáltuk a CAG-EGFP rendszert olyan sejtfelszíni fehérjék expressziója szempontjából, mint a SIRPA, a VCAM1 és az ALCAM. Ezek az irodalom alapján szívizomspecifikus fehérjéknek számítanak és expressziójuk alapján korai és késői szívizomsejtek válogathatóak ki a differenciációs tenyészetekből. Megfigyeléseink alapján elmondható, hogy a CAG-EGFP^{erős} sejtek korábban megjelennek a differenciáció során, mint a SIRPA-t kifejező sejtek, de a differenciáció előrehaladtával a CAG-EGFP^{erős} progenitor sejteken is megjelennek ezek a szívizomspecifikus fehérjék.

4. A kiválogatott CAG-EGFP^{erős} szívizom progenitorok tenyésztési körülményeinek vizsgálata

A CAG-EGFP^{erős} sejtek további vizsgálata annak kiderítésére irányult, hogy melyik az a tenyésztési körülmény, amely leginkább alkalmas a kiválogatott progenitor sejtek tenyésztésére és további szívizom irányú differenciáltatására. Két különböző egysejtrétegű és egy három dimenziós szuszpenziós tenyésztési módszert hasonlítottunk össze, melyeket kétféle tenyésztőfolyadékkal kombináltunk. QPCR analízis segítségével kimutattuk, hogy a CAG-EGFP^{erős} progenitorok szívizomképzési képessége a sejtek aggregáltatása és a három dimenziós aggregátumok szuszpenziós tenyészetben történő differenciáltatása során őrződik meg leginkább.

5. A CAG-EGFP^{erős} szívizom progenitorokból szívizomsejtekben dús tenyészet állítható elő

A szívizom progenitor sejtek további vizsgálata érdekében a differenciáció 10. és 12. napján kiválogattunk CAG-EGFP^{erős} és CAG-EGFP^{gyenge} sejteket és az ezekből létrehozott

aggregátumokat szuszpenziós kultúrában tenyésztettük tovább. Spontán kontrakció a tenyésztés 25. napján volt először megfigyelhető és körülbelül a CAG-EGFP^{erős} aggregátumok 30%-ánál volt tapasztalható, míg a CAG-EGFP^{gyenge} aggregátumok egyike sem mutatott spontán aktivitást. Ennek megfelelően a CAG-EGFP^{erős} aggregátumok szignifikánsan magasabb mértékben expresszálták a vizsgált szívizomspecifikus géneket, mint a CAG-EGFP^{gyenge} aggregátumok. Továbbá a szívizomspecifikus gének transzkripciója jóval magasabb szintet mutatott ezekben az érett szívizomsejtekben, mint a kiválogatott CAG-EGFP^{erős} progenitorokban, ami szintén a szívizom progenitorok szívizomsejtté történő érését bizonyítja.

6. A CAG-EGFP^{erős} aggregátumok növekedését és szívizom irányú differenciációját elősegítő tenyésztési körülmény beállítása

Tapasztalataink azt mutatták, hogy a kiválogatott sejtek aggregálódási és túlélési képessége rendkívül gyenge, hiszen egy nappal az áramlási citometriás sejt kiválogatás után a formálódó CAG-EGFP^{erős} aggregátumok körül jelentős sejtörmelék felhő volt megfigyelhető. Ha egy ROCK gátlószerrel, a Thiazovivinnel kezeltük a frissen kiválogatott progenitorokat, akkor az aggregációs és ezáltal a túlélési képessége is javult a sejteknek. Hasonló hatást értünk el akkor is, ha END-2 sejtekkel kondicionált tenyésztőfolyadékban (médiumban) aggregáltattuk a kiválogatott sejteket. Az END-2 egy egér viszkerális endoderma sejt vonal, ami arról ismert, hogy az őssejtek szívizom irányú differenciációját képes elősegíteni, ha az őssejteket END-2 sejtrétegen (úgynevezett kokultúrában) differenciáltatják. A mi rendszerünkben az END-2 szívizom irányú differenciációt elősegítő hatása nem volt tapasztalható, ugyanakkor ennek a tenyésztési körülménynek az alkalmazásakor tapasztaltuk az aggregátumok esetében a legnagyobb méretbeli növekményt. A beta-adrenerg agonista Izoproterenol hosszú távon való rendszeres adagolásával a CAG-EGFP^{erős} progenitorok szívizom irányú differenciációja végbe tudott menni az END-2 kondicionált médiumban való tenyésztés során is.

Következtetések

1. A CAG promóter által meghajtott EGFP fehérje kifejeződése lehetővé teszi a transzgenikus humán embrionális őssejtek kiválogatását. Ugyanakkor a CAG-EGFP-t expresszáló őssejtekből differenciálódott szívizomsejtek is könnyen azonosíthatóak a kifejezetten erős EGFP expresszió alapján, ami annak a következménye, hogy a CAG promóter szívizomsejtekben különösen erős transzkripciós aktivitást mutat. Ez a CAG promóter általunk használt verzióját jellemző kettős tulajdonság vezetett a “kettős arcú” promóter elnevezéshez.

2. A human embrionális őssejtek kardiogén mezoderma irányú irányított differenciációja a CAG-EGFP^{erős} progenitor populáció feldúsulását eredményezi.

3. A CAG-EGFP rendszer segítségével olyan szívizom progenitor sejtek válogathatóak ki, amelyekben kezdetben alacsony az *NKX2.5* mRNS szintje. A differenciáció későbbi szakaszában a CAG-EGFP^{erős} populáció sejtjein megjelennek a szívizomsejtekre jellemző *SIRPA*, *VCAM1* és *ALCAM* fehérjék.

4. A kiválogatott CAG-EGFP^{erős} progenitorok három dimenziós aggregátumok formájában differenciálódva képesek szívizom irányú elköteleződésüket megőrizni.

5. A CAG-EGFP^{erős} progenitor sejtekből spontán kontrakciót mutató 3D aggregátumok hozhatók létre, amelyekben a sejteknek több, mint 90%-a érett szívizomsejt. Az aggregátumoknak magas az *NKX2.5* és *MYL7* mRNS expressziója, ami atriális típusú szívizomsejtek keletkezésére utal. A CAG-EGFP^{erős} populáció sejtjei a korábban leírt kardiovaszkuláris progenitor populációknál szűkebb differenciációs potenciállal bírnak, hiszen a CAG-EGFP^{erős} progenitorokból simaizom sejtek és atriális típusú szívizomsejtek differenciálódtak, míg a kardiovaszkuláris progenitorokra jellemző endotél utódsejtek nem keletkeztek belőlük.

6. A CAG-EGFP^{erős} progenitorok aggregációs és túlélési képessége jelentősen javult ha egy ROCK gátlószerrel, a Thiazovivinnel lettek kezelve, illetve az END-2 sejtekkel kondicionált médiumban való differenciáltatásuk is hasonló eredménnyel zárult. Ez a jótékony hatás az aggregátumok méret- és sejtszámbeli növekedésében is megnyilvánult, különösen az END-2 kondicionált médiumban való differenciáltatás esetében. Ugyanakkor az END-2 sejtek irodalomból ismert szívizom irányú differenciációt elősegítő hatása a mi kísérleti körülményeink között nem volt tapasztalható. Egy beta-adrenerg agonistával, az Isoproterenollal törénő kezelés hatására azonban az END-2 kondicionált médiumban való tenyésztés is a CAG-EGFP^{erős} progenitorok szívizom irányú differenciációját eredményezte, miközben a tenyésztési körülmény sejtmenyiségre gyakorolt pozitív hatása megőrződött.

A "kettős arcú" CAG promóter egyedülálló lehetőséget biztosít a korai szívizom progenitoroktól az érett szívizomsejtekig tartó szívizom irányú differenciáció nyomkövetésére, valamint ezeknek a különböző stádiumú sejteknek a kiválogatására és sejtfelszíni fehérjé mintázatainak a vizsgálatára.

Disszertáció alapjául szolgáló közlemények

- 1 Szebenyi K, Péntek A, Erdei Z, Varady G, Orban TI, Sarkadi B, Apati A. (2014) Efficient Generation of Human Embryonic Stem Cell-Derived Cardiac Progenitors Based on Tissue-Specific EGFP Expression. *Tissue Eng Part C Methods*, Online Ahead of Print. IF: 4.254*
- 2 Orbán TI, Apáti Á, Németh A, Varga N, Krízsik V, Schamberger A, Szébenyi K, Erdei Z, Várady G, Karászi É, Homolya L, Német K, Gócza E, Miskey C, Mátés L, Ivics Z, Izsvák Z, Sarkadi B. (2009) Applying a "double-feature" promoter to identify cardiomyocytes differentiated from human embryonic stem cells following transposon-based gene delivery. *Stem Cells*, 27:(5) pp. 1077-1087. IF: 7.747

Disszertációtól független publikációk

- 1 Erdei Z, Lőrincz R, Szébenyi K, Péntek A, Varga N, Likó I, Várady Gy, Szakács G, Orbán TI, Sarkadi B, Apáti Á. (2014) Expression pattern of the human ABC transporters in pluripotent embryonic stem cells and in their derivatives. *Cytometry B Clin Cytom*, 86: 299-310. IF: 2.283*
- 2 Apáti A, Pászty K, Hegedus L, Kolacsek O, Orbán TI, Erdei Z, Szébenyi K, Péntek A, Enyedi A, Sarkadi B. (2013) Characterization of calcium signals in human embryonic stem cells and in their differentiated offspring by a stably integrated calcium indicator protein. *Cell Signal*, 25:(4) pp. 752-759. IF: 4.471
- 3 Erdei Z, Sarkadi B, Brozik A, Szebenyi K, Varady G, Makó V, Pentek A, Orban TI, Apati A. (2013) Dynamic ABCG2 expression in human embryonic stem cells provides the basis for stress response. *Eur Biophys J*, 42:(2-3) pp. 169-179. IF: 2.474
- 4 Nagy L, Milano F, Dorogi M, Agostiano A, Laczko G, Szebenyi K, Varo G, Trotta M, Maroti P. (2004) Protein/lipid interaction in the bacterial photosynthetic reaction center: Phosphatidylcholine and phosphatidylglycerol modify the free energy levels of the quinones. *Biochemistry*, 43:(40) pp. 12913-12923. IF: 4.008