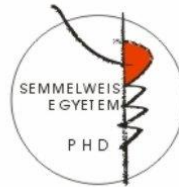


# **Humán pluripotens őssejt-eredetű endothelsejtek jellemzése**

PhD Doktori Tézisek

**Dr. Gara Edit**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Földes Gábor PhD

Hivatalos bírálók: Dr. Pirty Melinda PhD  
Dr. Réthelyi János PhD

Szigorlati bizottság elnöke:  
Dr. Ferdinandy Péter DSc

Szigorlati bizottság tagjai:  
Dr. Jánoskúti Lívía PhD  
Dr. Apáti Ágota PhD

Budapest, 2015

## BEVEZETÉS

Jelenleg nem áll rendelkezésre olyan sejterápiás eljárás, amely a kardiovaszkuláris rendszer károsodásait követően a sérült sejtek funkcióját pótolná és a sejtek fiziológiás működését helyettesítené. Az elmúlt évtizedben számos sejtípust vizsgáltak jövőbeni terápiás felhasználás reményével. A korai kutatások endotheliális progenitor sejtek, csontvelői eredetű mononukleáris sejtek és a mesenchymális őssejtek terápiás alkalmazását célozták. Az első klinikai vizsgálatok mérsékelten pozitív eredményekkel zárultak, azonban a későbbi meta-analízisek szerint számos kétes adatot publikáltak. A kardiovaszkuláris regeneratív medicinában kiemelkedően fontos szerepe lehet a humán pluripotens őssejteknek. A humán embrionális őssejtek (hESC) a blasztociszta stádiumú embrió belső sejtcsomójából származnak, míg a humán indukált pluripotens őssejtek (hiPSC) felnőtt testi sejtek genetikai visszaprogramozásával hozhatóak létre. A két pluripotens őssejtípus mindhárom csíralemez származékaivá képes differenciálódni. A regeneratív sejterápia számára az ideális sejtípus könnyen, kellő mennyiségben izolálható, stabil kariotípussal és fenotípussal rendelkezik, hatékonyan és biztonságosan differenciáltatható a kívánt sejtípussá, nem immunogén és *in vivo* is rendelkezik funkcionális aktivitással. A hiPSC alkalmazásánál nem merülnek fel a hESC-nél releváns etikai problémák; a visszaprogramozás során azonban olyan genetikai és epigenetikai módosulások jöhetnek létre, amelyek befolyásolhatják a preklinikai vizsgálatok eredményeit és később terápiás alkalmazhatóságukat is.

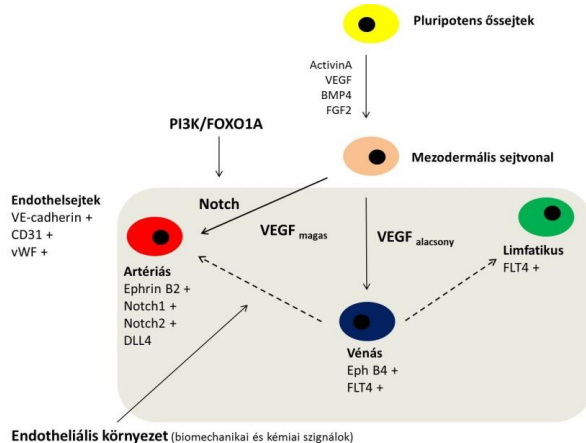
PhD munkámban a humán pluripotens őssejtek endothelsejt származékaival (hESC-EC, hiPSC-EC) foglalkoztam. Az endothelsejtek kiemelt szerepet töltenek be a kardiovaszkuláris rendszer működésében. Megfelelő funkciójuk elengedhetetlen a vaszkuláris tónus és a mikrocirkuláció szabályozásában. Befolyásolják továbbá a véralvadási kaszkádot és olyan mediátorokat termelnek, melyek szabályozzák a

vérlemezzék aktivációját és összecsapzódását. Az endothelium diszfunkciója fontos patológiás lépés a kardiovaszkuláris betegségek kialakulásában, így hypertóniában, atheroszklerózisban és diabetes mellitusban is.

Az endothelium sokrétű működését mutatja, hogy az artériás és vénás endothelsejtek nem csak a keringési rendszeren belüli lokalizációjukban, hanem egyéb tulajdonságaikban is különböznek. Az artériás endothelsejtek fő feladata a prekapilláris rezisztencia erek tónusának szabályozása, ezáltal a teljes perifériás vaszkuláris rezisztencia meghatározása. A vénás endothelsejtek vazóaktív, értónust meghatározó szerepe kevésbé jelentős, de a bal kamrai előterhelést a vénás visszaáramlás változásán keresztül befolyásolják. A posztkapilláris venulákban és vénákban zajlanak a lokális gyulladásos folyamatok, például a fehérvérsejtek kitapadása és extravazációja. A mikroenvironmenti hatások (így a parakrin mediátorok és a falı nyıróerő) az artériás és vénás sejtek fenotípusát, funkcionális hatásait is befolyásolhatják: véna saphena graftok például jó angiológiai és funkcionális eredménnyel transzplantálhatóak koronária artéria áthidaló műtétek során. A felnőtt endothelsejtek specifikációja a környezeti hatások mellett, azonban transzkripciós szinten is szabályozott mechanizmus. Az embrionális vaszkulogenezis során az artériás és vénás endothelsejtek fejlődnek ki elsőként, míg a nyirokér endothelsejtek a vénás endothelsejtek későbbi átalakulásából jönnek létre. Az artériás fejlődésért felelős jelátviteli utak közül a VEGF és Notch a legfontosabbak. Az artériás endothelsejtek fejlődését a Notch1, Notch2, EphrinB2 és DLL4 jelátvivő molekulák egyaránt indukálják. Az EphB4 és FLT4 elsősorban a vénák fejlődését szabályozza, utóbbi a fő szabályozó a lymphatikus sejtek kifejlődésében is. Egy friss tanulmány kimutatta, hogy a FOXO1 transzkripciós faktor (a foszfatidil-inozitol-3-kináz (PI3K) jelátviteli út tagja) a Notch1 aktiválásán keresztül artériás endothelsejtek kialakulását aktiválja. A PI3K egy lipid kináz, amely fontos szerepet játszik a sejtproliferációban, sejtadhézióban, DNS javításban, a sejtek

öregedésének kontrolljában és az őssejtek pluripotens állapotának fenntartásában is. A PI3K jelátviteli út számos helyen befolyásolható aktiváló- és gátlószerek alkalmazásával, így fontos új farmakoterápiás célpontként szolgál malignus megbetegedésekben és diabetes mellitusban is. A rendszer központi eleme az említett FOXO transzkripció faktor család, egyes tagjai szabályozói a kardiovaszkuláris rendszer embrionális fejlődésének. Állatkísérleti modellben kimutatták, hogy a FOXO1A-deficiens embriók 11 napon elpusztulnak, a szív és az erek fejlődésének hiányában. A FOXO1A az endothelsejtek differenciációjában és proliferációjában is fontos szerepet játszik. Egér embrionális őssejt-eredetű endothelsejtek FOXO1A hiányában nem reagálnak a VEGF által közvetített, érképzésért felelős jelátviteli utakra. Az őssejt-eredetű endothelsejtekben a PI3K-FOXO1A jelátviteli út pontos megismerése és a szabályozó molekulák azonosítása elősegítheti a sejterápiás és szövetépítési felhasználásukat.

### 1. ábra Endothelsejt differenciáció humán pluripotens őssejtekből



## CÉLKITŰZÉS

Munkám célja az volt, hogy humán pluripotens őssejtekből endothelsejteket hozzak létre létrehozása, majd azok *in vitro* és *in vivo* tulajdonságait jellemezzem. Az őssejt-eredetű endothelsejtek *in vitro* és *in vivo* viselkedésének részletes megismerése és preklinikai vizsgálata elősegíti a későbbi terápiás felhasználásukat iszkémiás kardiovaszkuláris megbetegedésekben.

Részletes célok:

1. Endothelsejt differenciációs protokollok optimalizálása. A létrehozott endothelsejtek *in vitro* tulajdonságainak jellemzése, különös tekintettel az érképzéshez kapcsolódó markerekre és az artériás és vénás szubpopulációkra.
2. A PI3K/FOXO1A jelátviteli út szerepének vizsgálata az endothelsejtek differenciációjában, proliferációjában, sejthalálzásban és az érképzéshez kapcsolódó tulajdonságaikban.
3. Háromdimenziós endothelsejt kultúra létrehozása vaszkuláris szövetépítési céllal sertés és humán extracelluláris mátrix alkalmazásával, bioreaktorban.
4. Az endothelsejtek funkcionális vizsgálata: thrombocytá aggregáció-gátló hatás jellemzése.
5. Az őssejt-eredetű endothelsejtek érésének vizsgálata *in vivo*.

# MÓDSZEREK

## I. Sejttenyésztés

A sejtek tenyésztése steril körülmények között, sejttenyésztő fülkében történt. A sejt kultúrák fenntartását sejttenyésztő szekrényekben, 37°C-on, 5% CO<sub>2</sub> és 21% O<sub>2</sub> jelenlétében végeztük. A Városmajori Klinika Őssejt Laboratóriuma minden szükséges etikai és működési engedéllyel rendelkezik pluripotens őssejtvonalak vizsgálatához. A hESC közül a WA007 (H7) humán embrionális őssejtvonalat vizsgáltuk (*WiCell Research Institute Bank, Madison, USA*). A hiPSC-eket az Osaka Egyetem kutatócsoportja biztosította kísérleteinkhez (*ReproCell, Kanagawa, Japán*), illetve a WiCell cégtől vásároltuk (*IMR-90-4*). A felnőtt fibroblasztokból általunk létrehozott pluripotens őssejtek (epizomális plazmid, transzfekció pluripotencia génekkel) a kísérletek további fázisaiban nem kerültek felhasználásra. Minden pluripotens őssejtvonalat dajkasejtek nélkül, mTeSR1 tápfolyadékban tenyésztettünk. Kombinált mechanikus és enzimátikus passzálás 4-10 naponta történt. Az őssejt-eredetű endothelsejtek és kontroll endothelsejtek (HUVEC: humán umbilikális véna, HCAEC: humán koronária artéria, HAEC: humán aorta, BOEC: vérből izolálható progenitorok) zselatin felszínen, EGM2 tápfolyadékban nőttek. Kísérleteinkben 2-6 között passzált endothelsejteket vizsgáltunk.

A háromdimenziós sejt kultúra létrehozásához az endothelsejteket sertésbél extracelluláris mátrixon vagy decellularizált humán aorta mátrixon vizsgáltuk. Az aorta decellularizációt detergens oldattal végeztük. Az endothelsejteket extracelluláris mátrixokon tenyésztettünk (50000 sejt/ 0.5cm<sup>2</sup> biomátrix) kis bioreaktor rendszerben (*Corning spinner flask*).

Az érfali nyíróerő *in vitro* modellezése során a tápfolyadék standardizált áramoltatása lamináris vagy turbulens áramlást hozott létre a sejttenyésztő edény meghatározott pontjain. A nyíróerő hatására az endothelsejtek morfológiáját és sejt kultúráján belüli elrendeződését vizsgáltam. A sejt kultúrák morfológiai változásait inverz fénymikroszkópban követtem.

## II. Endothel differenciáció

Az endothel differenciációs protokollok közül az un. embrionális testecske (EB) és *monolayer* módszereket egyaránt alkalmaztam. Az embrionális testecskéket a pluripotens őssejt kolóniák mechanikus passzálása során hoztuk létre. A pluripotens őssejtek mezodermális irányú differenciációját a tápfolyadékhoz adott növekedési faktorok és morfogén molekulák serkentették (Activin A, FGF-2, VEGF<sub>165</sub> és BMP4). A differenciálódó progenitor sejtek Stemline II tápfolyadékban nőttek. Az EB-ket szuszpenzióban normoxiás és hypoxiás körülmények között, alacsony adherenciájú tenyésztőedényben tartottuk négy napig. Négy nap után az EB-ket zselatin borítású tenyésztőlemezekre tettük és 13 napon át differenciáltattuk, EGM2 tápfolyadékban. A CD31-pozitív endothelsejteket ezt követően fluoreszcencia aktiválta sejt szeparációs (FACS) technikával válogattuk ki a sejt kultúrából.

## III. Sejtkezelések

A differenciálódó őssejteket és a létrehozott, differenciált endothelsejteket PI3K gátló/FOXO1A aktiváló LY294002 molekulával kezeltem (10 $\mu$ M, 24h). A FOXO1A gátlását FOXO1A siRNS kezelés (10nM, 6 h és 24h) hozta létre a differenciálódó és az endothel populációban. *Non-targeting* (NT) siRNS (10 nM) kezelés szolgált kontrollként. A FOXO1A *overexpresszióját* FOXO1A-eGFP plazmid kezeléssel hoztam létre. A plazmidot elektroporézissel juttattam a sejtekbe. A PI3K/FOXO1A jelátviteli út szerepét a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> kiváltotta sejthalálózásban is vizsgáltam. A sejthalálózást H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indukálta (magas dózis: 900 $\mu$ M, közepes dózis: 600 $\mu$ M, alacsony dózis: 300 $\mu$ M; 12h).

## **IV. Endothelsejtek jellemzése**

### ***Matrigél tubulus képzés***

A kontroll, LY294002, NT és FOXO1A siRNS előkezelt endothelsejteket Matrigél extracelluláris mátrixon 24 órát tenyésztettem (50000 sejt/lyuk). A sejtmagok Hoechst-33342 festését követően a sejtkultúrákat és a kialakult tubulus hálózatokat automatizált mikroszkópon (*Cellomics ArrayScanner*) vizsgáltam. Az alkalmazott képfeldolgozó algoritmus lehetőséget adott a létrejött tubuláris struktúrák kvantifikálására.

### ***Immuncitokémia és immunhisztokémia***

Az endothelsejtek jellemzésére immuncitokémiai vizsgálatokat végeztem. A sejteket anti-humán CD31, anti-humán vWF, anti-humán DLL4 és anti-humán FOXO1A antitestekkel jelöltem. Szekunder antitestként AlexaFluor 546-ot használtam. A sejtmagokat Hoechst-33342-vel jelöltem. A sejthalálózási kísérletekben vitális festékként, a nekrozis kimutatására TOTO-1-et vagy TO-PRO-3-at használtam. Az immunhisztokémiai vizsgálatokban paraffinba ágyazott háromdimenziós sejtkultúra mintákat vizsgáltam. A hisztológiai szekvenciák a 3D-HisTech rendszerben készültek. A szövettani vizsgálatok során az endothelsejteket anti-humán CD31 antitesttel jelöltem. Az endothelsejtek lokalizációja és proliferációja a háromdimenziós biomátrixokon jellemezhető.

### ***Génexpressziós vizsgálatok***

A sejtekből az RNS extrakciót követően kvantitatív, valós idejű, PCR vizsgálatokat és PCR *array* vizsgálatot végeztem. RNS-ből reverz transzkriptáz enzim komplement DNS szálakat szintetizált. Az endotheliális gének közül a Notch1, Notch2, EphrinB2, EphB4, FLT4, ve-Cadherin, Angiopoietin-2, Tie-2, CD31 és NOS-3 mRNS szinteket vizsgáltam. Kontroll, *housekeeping* génként humán gliceraldehid 3-foszfát dehidrogenáz (GAPDH) szolgált. A relatív génexpressziókat  $\Delta\Delta C_t$  módszerrel határoztam meg.



## ***Fehérjetermelés, ELISA vizsgálatok***

Endothelsejt szekrétumok és sejtlizátumok fehérje mintázata is azonosításra került. Az endothelsejtek fehérjetermelését angiogenezis és hematopoietikus szolubilis receptor fehérje vizsgálati *assay*-kben tanulmányoztam. Az *assay*-k membrán pixel denzitását *ImageJ* szoftverrel kvantifikáltam. ELISA vizsgálatokban a sejtek humán IL-6, IL-8 és endothelin-1 termelését határoztam meg. A hESC-EC és hiPSC-EC thrombocytá aggregáció gátló tulajdonságait Rantes *assay* segítségével vizsgáltam: a háromdimenziós vaszkuláris struktúrákat thrombocytá-dús plazmával inkubáltuk, ezután az aktivált thrombocytákból felszabaduló Rantes szintjét mértük.

## ***V. In vivo kísérletek***

A hESC-EC, hiPSC-EC és kontroll HUVEC *in vivo* túlélését, szöveti beépülését és érképzéshez kapcsolódó tulajdonságait athymiás, patkányokban (*Crl:NIH-Foxn1<sup>tmu</sup>*, *Charles River*) vizsgáltuk. Előzetes engedélyek birtokában az állatok mikrobamentes állatházban voltak tartva; az operáció előtt Ketamin-Xylazin szedato-analgéziában (80-100 mg/kg és 5-10mg/kg) részesültek. A szubkután implantált sejtsomagok  $10^6$  endothelsejtet, extracelluláris mátrix Matrigélt (250 $\mu$ l), továbbá heparint (64U/ml), rekombináns egér fibroblaszt növekedési faktort (80ng/ml) és EGM2 tápfolyadékot (70 $\mu$ l) tartalmaztak. Az implantációt követő két hét múlva A CD31 pozitív sejteken génexpressziós vizsgálatokat végeztem.

## ***VI. Statisztika***

A statisztikai elemzéseket *GraphPad Prism 5* szoftverben végeztem. Az eredményeket átlag  $\pm$  átlag szórása (SEM) formában mutatom be. A statisztikai elemzések során Student t-tesztet, egy utas varianciánálizist és Tukey utólagos tesztet alkalmaztam. Szignifikancia: \*  $p < 0.05$ ,

\*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

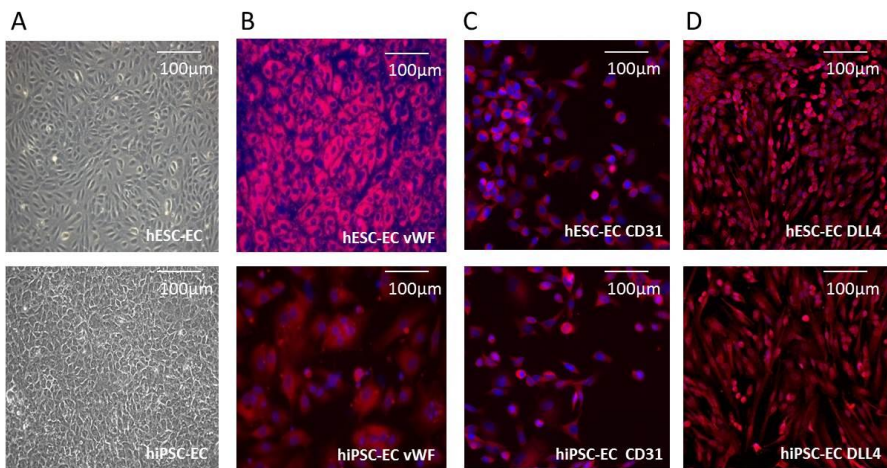
# EREDMÉNYEK

## I. Humán pluripotens őssejt-eredetű endothelsejtek jellemzése

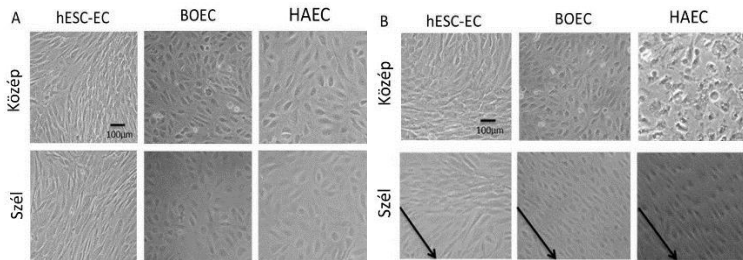
A hESC-EC és hiPSC-EC utcakő rajzolatot mutattak *in vitro* (2. ábra A). Immunocitokémiai vizsgálattal a hESC-EC és hiPSC-EC von Willebrand faktor, CD31 és DLL4 (artériás endothel marker) pozitivitást mutattak (2. ábra B-D).

A vizsgált endothelsejtek (HAEC és BOEC) utcakő rajzolatot hoztak létre *in vitro* (3. ábra A). A fali nyíróerő hatására a HAEC és BOEC sejtek megváltoztatták morfológiájukat: megnyúltak és sorba rendeződtek lamináris áramlás hatására; de a sejt kultúrák megtartották utcakő rajzolatukat turbulens áramlás mellett is (3. ábra B). Humán ESC-EC nyíróerő hatására nem változtatták morfológiájukat (3. ábra B).

**2. ábra** Humán embrionális és indukált pluripotens őssejt-eredetű endothelsejtek morfológiai és immuncitokémiai jellemzői *in vitro*

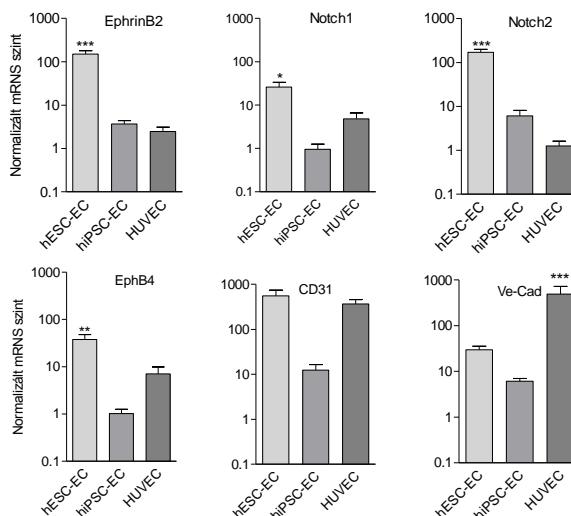


**3. ábra** Az endothelsejtek morfológiai változásai a nyíróerő modellezése során *in vitro*



Kvantitatív, valós idejű PCR vizsgálattal az érképzéshez kapcsolódó gének fokozott expressziója volt kimutatható hESC-EC és hiPSC-EC-ben. Szignifikáns emelkedés volt az artériás (EphrinB2, Notch1, Notch2) és vénás (EphB4) marker-gének mRNS szintjében az endothel differenciáció során. Az endothel szubpopulációk markereinek mRNS szintjei között szignifikáns különbségek nem voltak. Az érképzéshez közvetlenül kapcsolódó marker gének, így a CD31 és a ve-cadherin, szignifikánsan magasabb mRNS expressziót mutattak hESC-EC és hiPSC-EC-ben, mint a pluripotens őssejtekben (4. ábra).

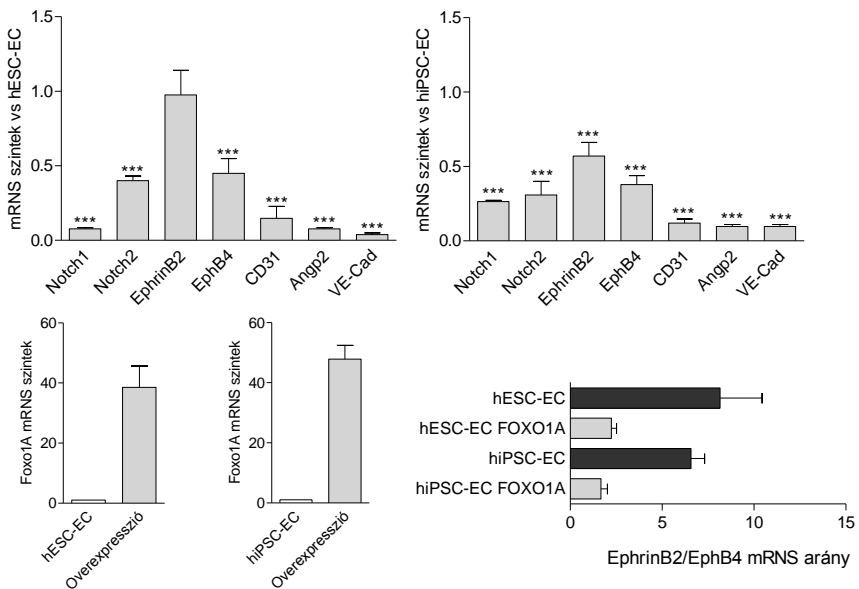
**4. ábra** hESC-EC és hiPSC-EC endotheliális génexpressziós mintázata



## II. PI3K/FOXO1A jelátviteli út szerepe az endothelsejtek szubpopulációiban, angiogenezisében, proliferációjában és túlélésében

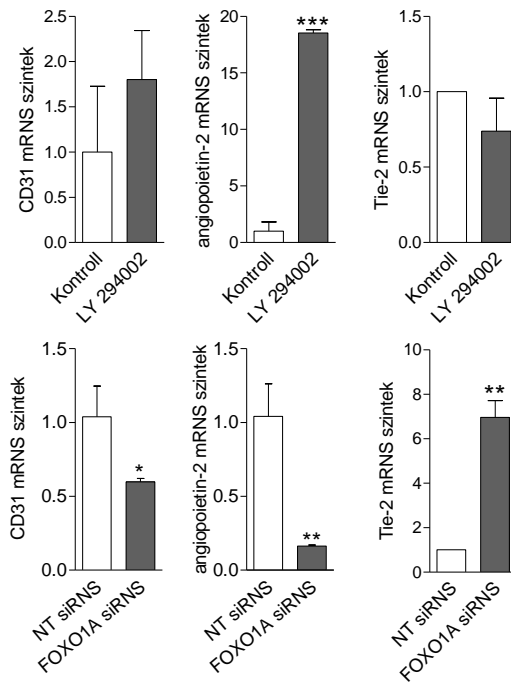
FOXO1A *overexpresszió* hatására a vizsgált endotheliális marker gének mRNS szintje szignifikánsan csökkent. Az érképzéshez kapcsolódó CD31 és ve-cadherin mRNS szintek érdemi csökkenést mutattak; továbbá, az artériás és vénás marker gének szintjei párhuzamosan szintén csökkentek (5.ábra). Az artériás fenotípusra utaló EphrinB2/EphB4 arány csökkenő tendenciát mutatott FOXO1A *overexpressziót* követően hESC-EC és hiPSC-EC sejtekben.

**5. ábra** FOXO1A *overexpresszió* hatása a vizsgált gének expressziójára

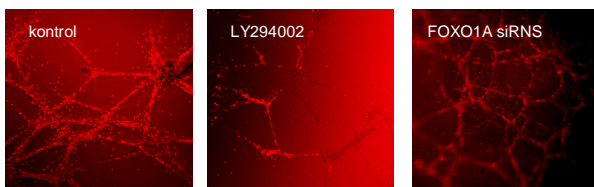


A CD31 és angiopoietin-2 mRNS szintek megemelkedtek FOXO1A aktivátor LY294002 hatására; viszont FOXO1A siRNS kezelés szignifikánsan csökkentette az expressziójukat (6. ábra). Az angiopoietin-2 receptor, Tie-2 mRNS szintjei az angiopoietin-2 expressziójával fordított változásokat mutattak. LY294002 csökkentette a Tie-2 mRNS szintet, míg FOXO1A siRNS növelte (6. ábra).

**6. ábra** PI3K/FOXO1A jelátviteli út befolyásolja az érképzéshez kapcsolódó gének expresszióját hESC-EC-ben

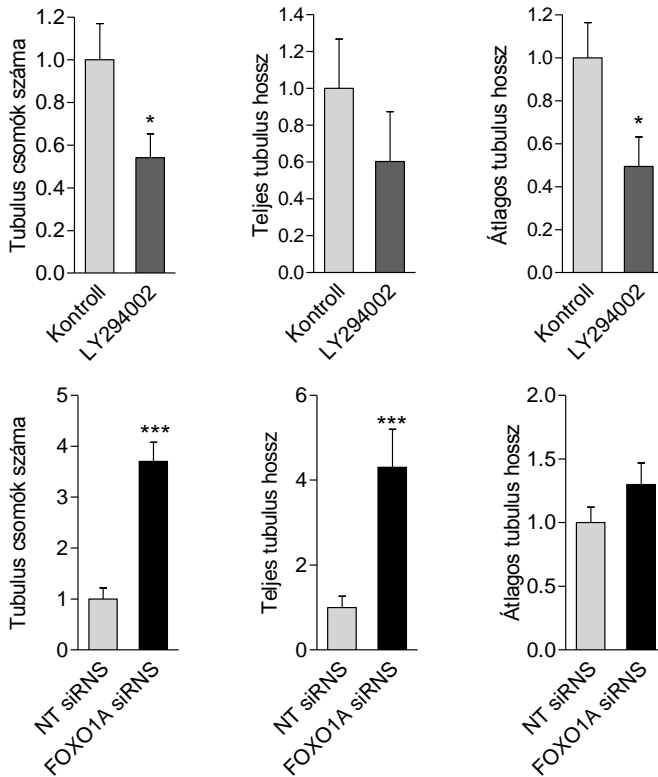


*In vitro* Matrigél tubulus képző *assay*-ben az LY294002 és FOXO1A siRNS kezelést követően vizsgáltam a hESC-EC migrációját és tubulus képzését (7. ábra). LY294002 egyaránt gátolta a hESC-EC tubulus képzését és migrációját, míg a FOXO1A siRNS enyhén fokozta a tubulus képző aktivitást *in vitro* (8. ábra). A Matrigél tubulus *assay* értékelésekor a teljes tubulus hossz és tubulus csomók száma került meghatározásra.



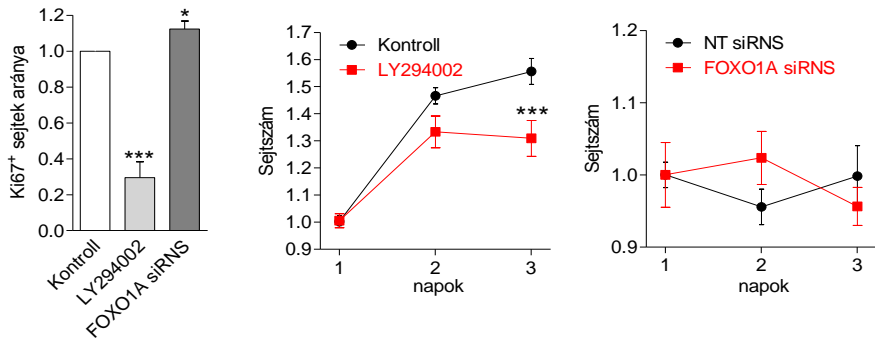
**7. ábra** Matrigél tubulus képző *assay*  
Kontroll, LY294002 és FOXO1A siRNS előkezelés.

## 8. ábra PI3K/FOXO1A jelátviteli út szabályozza a hESC-EC tubulus képzését *in vitro*



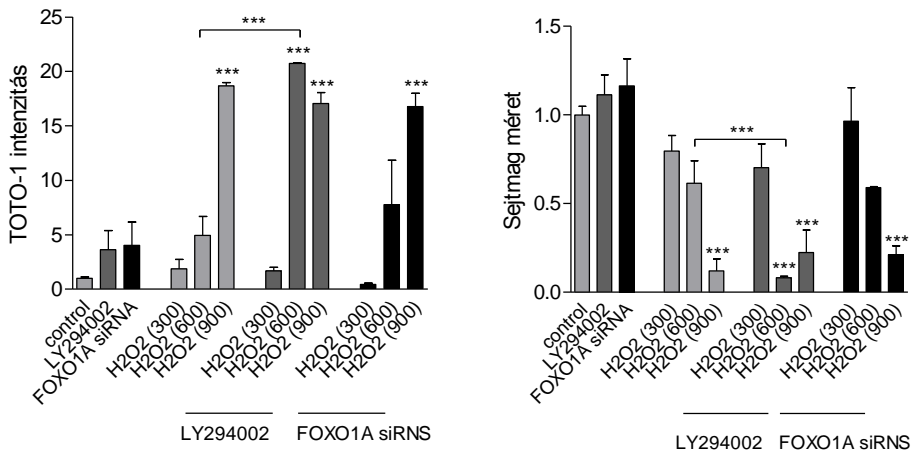
A hESC-EC proliferatív aktivitását Ki67 festéssel és kolónia képző assay-ben vizsgáltam. A  $Ki67^+$  sejtek aránya és kolónia formáló képessége csökkent a 3 napos LY294002 kezelés hatására (9. ábra); míg a FOXO1A csendesítése siRNS kezeléssel enyhén emelte a  $Ki67^+$  sejtek arányát, de nem volt hatással a sejtszámra (9. ábra).

## 9. ábra PI3K/FOXO1A jelátviteli út befolyásolja a hESC-EC sejtek proliferációját



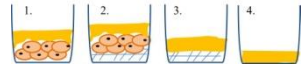
A PI3K/FOXO1A jelátviteli út az endothelsejtek életképességére és a sejthalálzásra gyakorolt hatását is vizsgáltam. A reaktív oxigén származék,  $H_2O_2$ , nekrozist és sejtmag szerkezeti átrendeződést hozott létre dózis-függő módon hESC-EC-ben (10. ábra). A FOXO1A csendesítése siRNS-sel nem befolyásolta a nekrozis marker TOTO-1 szintjét és nem volt közvetlen hatással a sejtmag szerkezeti változásaira sem (10. ábra). LY294002 kezelés hatására  $H_2O_2$  pro-nekrotikus hatásai fokozódtak (600  $\mu M$  dózis esetén).

## 10. ábra PI3K/FOXO1A jelátviteli út befolyásolja a $H_2O_2$ által kiváltott sejthalálzást



### III. Thrombocytá aggregáció gátlás, 3D sejtkultúrák környezetben

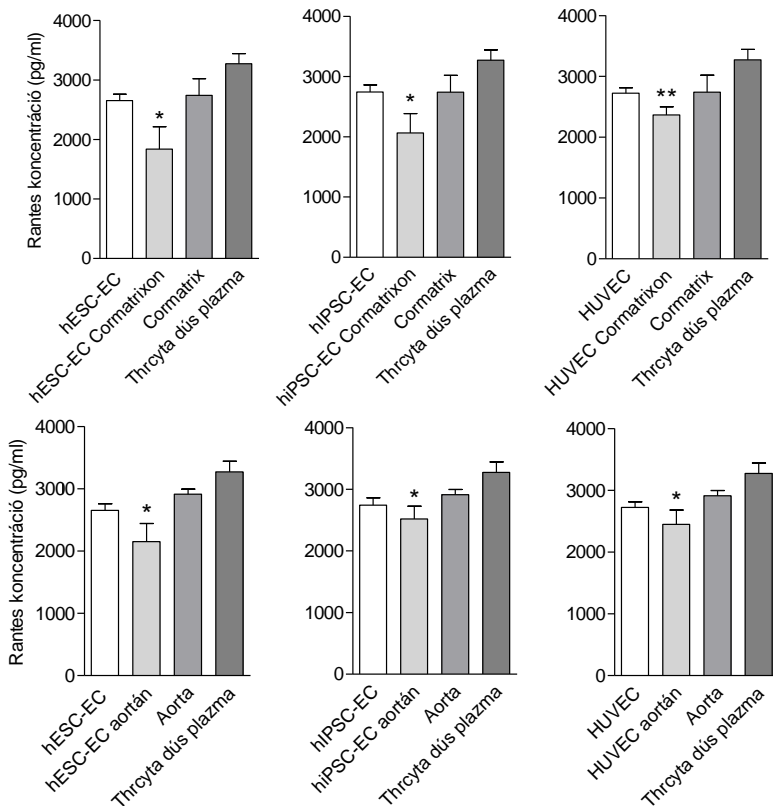
Az őssejt-eredetű endothelsejtek életképesek maradtak 3D sejtkultúrában. A thrombocytá aggregáció gátló *assay* eredményei kontroll és biomátrix+kontroll minták esetén azonosak voltak, jelezve, hogy a biomátrixok önmagukban nem thrombogének. Az endothelsejtek csökkentették a Rantes szekréciót, ami a thrombocytá aktiváció csökkenését jelzi. Az endothelsejtek antithrombogén hatása fokozódott a 3D sejtkultúrák környezet hatására (12. ábra).



**Figure 11.** Thrombocytá aggregáció gátló *assay*

1. Endothelsejtek+plazma
2. Biomátrix+sejtek+plazma
3. Biomátrix+plazma
4. Plazma (kontroll)

**Figure 12.** Thrombocytá aktiváció gátló hatás 3D sejtkultúrában

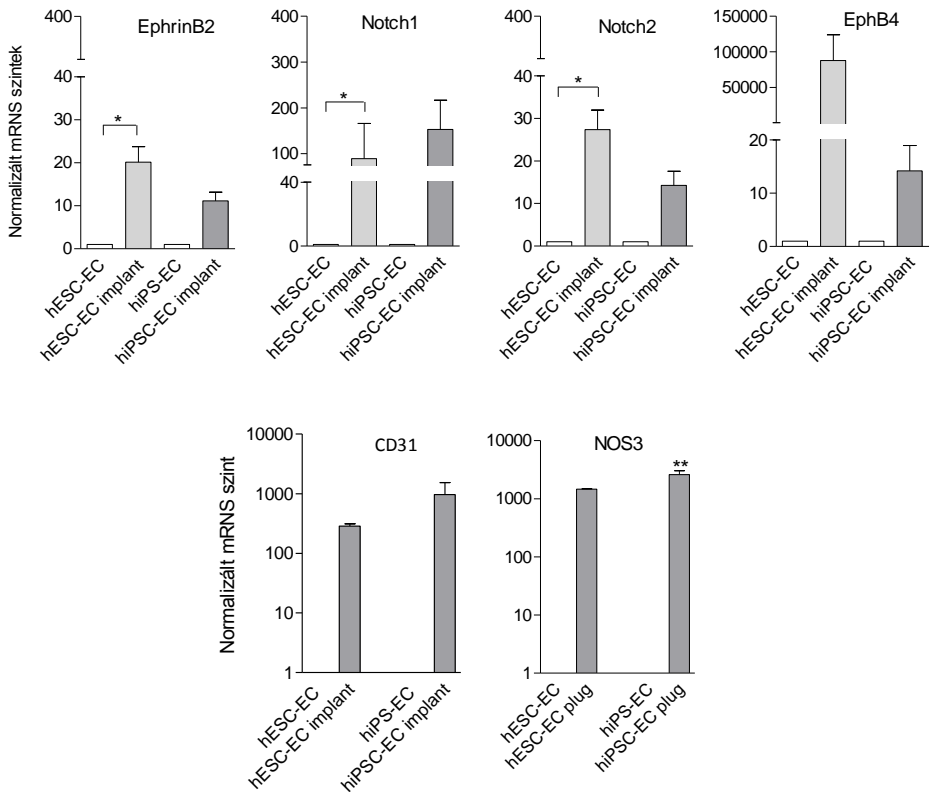




#### IV. Az összejt-eredetű endothelsejtek érése *in vivo*

A humán ESC-EC, hiPSC-EC és kontroll HUVEC szöveti beépülést mutatott *in vivo* transzplantáció során. A transzplantációt követően PCR vizsgálatot végeztünk. A transzplantált sejteken szignifikáns emelkedés volt kimutatható az általános, artériás és vénás endothel markerek szintjében. Minden vizsgált endothelsejten szignifikánsan emelkedett a CD31, NOS3, artériás (EphrinB2, Notch1 és Notch2) és vénás (EphB4) endothel markerek mRNS szintjeiben (13. ábra).

**Figure 13.** A hESC-EC, hiPSC-EC és HUVEC érése *in vivo*

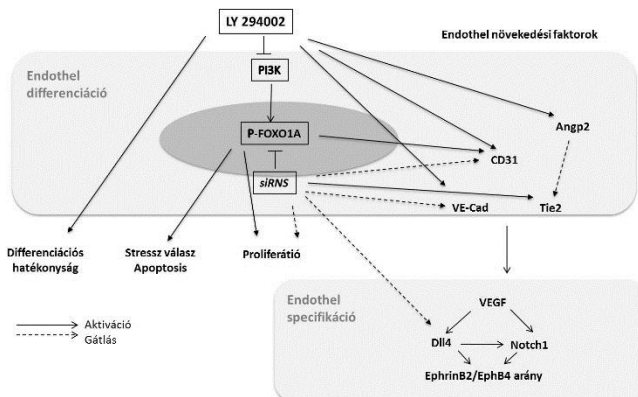


## KÖVETKEZTETÉSEK

A humán pluripotens őssejtekből hatékony differenciációs protokollok segítségével endothelsejtek hozhatóak létre. A hESC-EC és hiPSC-EC a kontroll endothelsejtekhez hasonló fenotípussal, immuncitokémiai tulajdonságokkal és endotheliális génexpressziós mintázattal rendelkeznek. Az általános endotheliális marker gének expressziója mellett az artériás és vénás markerek expressziója is magas volt. A hESC-EC és hiPSC-EC sejtek thrombocyta aktivációt gátló tulajdonsággal rendelkeztek 3D sejt kultúrában.

A PI3K/FOXO1A jelátviteli út fontos szabályozó az endothelsejtek differenciációjában, működésében és túlélésében (14. ábra). A FOXO1A aktiválása növelte az endothel differenciáció határfokát, de egyben csökkentette a differenciált sejtek proliferációját és az angiogenetikus aktivitását. A PI3K/FOXO1A befolyásolja az endothelsejtek reaktív oxigén származékokra adott válaszát és túlélését. A PI3K/FOXO1A jelátviteli út szerepének részletes megismerése fontos a pluripotens őssejt-eredetű endothelsejtek jövőbeni sejterápiás felhasználásában.

### 14.ábra Endothel differenciáció, artériás és vénás fejlődés, szabályozó mechanizmusok



## PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### Az értekezés témájában megjelent közlemények

1. Merkely B\*, **Gara E\***, Lendvai Z, Skopál J, Leja T, Zhou W, Kosztin A, Várady G, Mioulane M, Bagyura Z, Németh T, Harding SE, Földes G. (2015) Signalling via PI3K/FOXO1A Pathway Modulates Formation and Survival of Human Embryonic Stem Cell-Derived Endothelial Cells.  
Stem Cells Dev 24: 869-878.  
**IF: 3.727** \* *Megosztott első szerző*
2. Reed DM, Földes G, Kirkby NS, Ahmetaj-Shala B, Mataragka S, Mohamed NA, Francis C, **Gara E**, Harding SE, Mitchell JA. (2014) Morphology and vasoactive hormone profiles from endothelial cells derived from stem cells of different sources.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 455: 172-177.  
**IF: 2.300**
3. Kosztin A\*, **Gara E\***, Harding SE, Földes G. (2015) Stem Cell Therapy to Treat Heart Failure  
Reference Module in Biomedical Sciences, London, Elsevier  
**IF: N/A** \**Megosztott első szerző*
4. **Gara E**, Merkely B, Földes G. (2013) Össejtek és érrendszeri megbetegedések. Hogyan készítsünk ereket?  
Élet és Tudomány 68: 470-471.  
**IF: N/A**

## Egyéb közlemények

1. Kovács A, Tapolyai M, Celeng C, **Gara E**, Faludi M, Berta K, Apor A, Nagy A, Tislér A, Merkely B. (2014) Impact of hemodialysis, left ventricular mass and FGF-23 on myocardial mechanics in end-stage renal disease: a three-dimensional speckle tracking study. *International Journal of Cardiovascular Imaging* 30: 1331-1337.  
**IF: 2.539**
2. Debreczeni B, **Gara E**, Veresh Z, Márki A, Rácz A, Matics R, Hamar J, Koller Á. (2013) Hydrogen peroxide via thromboxane A<sub>2</sub> receptors mediates myogenic response of small skeletal muscle veins in rats. *Clin Hemorheol Microcirc* 54: 393-407.  
**IF: 2.242**
3. **Gara E**, Gesztes É, Doroszlai R, Zacher G. (2014) Sürgősségi császármetszés szén-monoxid-mérgezésben. *Orvosi Hetilap* 155: 871-875.  
**IF:N/A**