

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
Természettudományi és Informatikai kar

HUN-REN SZEGEDI BIOLÓGIAI
KUTATÓKÖZPONT
Biofizikai Intézet

37. OTDK Biológia szekció

**mRNS töltetű szolid lipid nanorészecskék
vizsgálata humán sejtenyészeteken**

Cser Nárcisz Mónika
molekuláris biológia MSc
II. évfolyam

Témavezető:

Dr. Veszeka Szilvia
tudományos főmunkatárs
HUN-REN SZBK Biofizikai Intézet
Biológiai Barrierék Kutatócsoport

Belső konzulens:

Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónika
habilitált egyetemi docens
oktatási intézetvezető-helyettes
SZTE TTIK
Biokémia és Molekuláris Biológia Tanszék

Szeged

2024

TARTALOMJEGYZÉK

1. BEVEZETÉS	3
1.1. A vér-agy gát, mint biológiai gátrendszer	3
1.2. A vér-agy gát sérülése központi idegrendszeri betegségekben.....	5
1.3. Nanorészecskék	6
1.4. Génbevitel (transzfekció)	7
1.5. A lipid nanorészecskék (LNP) jelentősége a transzfektálásban	9
1.6. Az endotélsejtek transzfektálhatósága.....	10
1.7. HeLa sejtvonal.....	11
2. CÉLKITŰZÉSEK.....	12
3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK.....	13
3.1. LNP előállítása.....	13
3.2. LNP-k jellemzése.....	13
3.3. Sejttenyésztés.....	14
3.4. Sejtek életképességének vizsgálata.....	15
3.5. LNP-k sejtfelvételi vizsgálata.....	16
3.6. Statisztikai elemzés.....	17
4. EREDMÉNYEK.....	18
4.1. LNP-k karakterizálása.....	18
4.2. LNP-k hatása a sejtek életképességre	18
4.3. LNP-k felvétele HeLa sejtekbe: vizualizáció	19
4.4. LNP-k felvétele HeLa sejtekbe: szubkonfluens és konfluens tenyészetek összehasonlítása	20
4.5. LNP-k felvétele hEC sejtekbe.....	21
4.6. LNP-k felvétele hEC sejtekbe: szubkonfluens és konfluens tenyészetek összehasonlítása	22
5. MEGBESZÉLÉS	24
5.1. Az LNP-k toxicitása.....	24
5.2. HeLa sejtek transzfektálása LNP-vel.....	24
5.3. Humán agyi endotélsejtek transzfektálása LNP-vel	25
5.6. További terveink az agyi endotélsejtek transzfektálására	26
6. ÖSSZEFOGLALÁS	27
7. IRODALOMJEGYZÉK	28
8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS	31
TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS.....	32

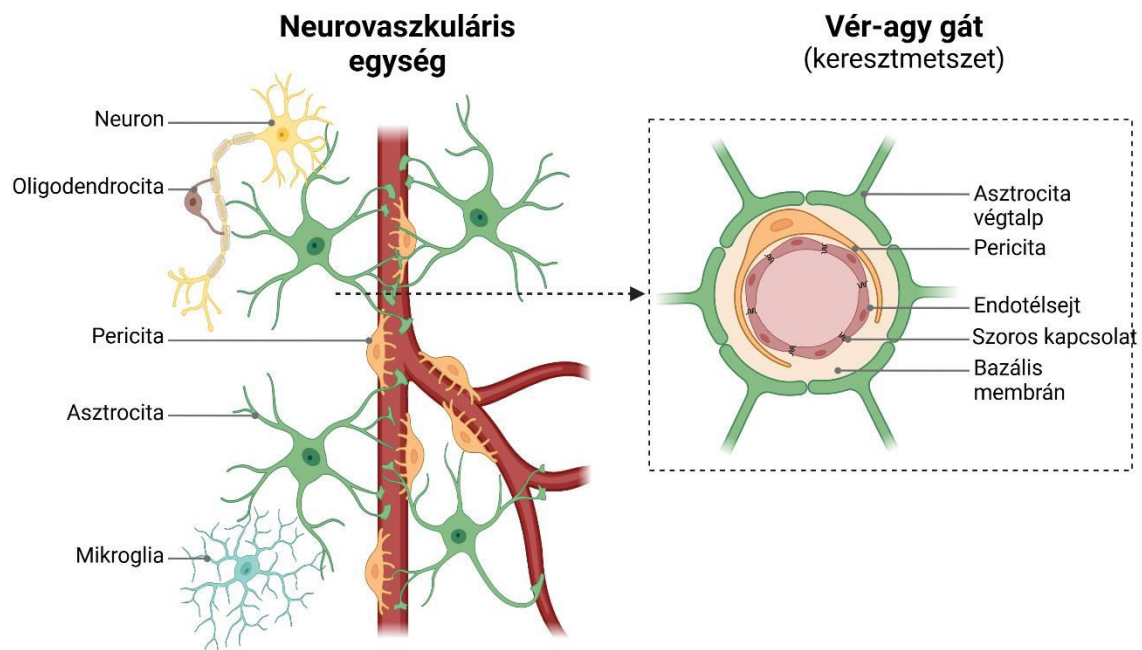
RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

AAV	adeno-asszociált vírus
DLS	dinamikus fényszórás
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle tápfolyadék
DMG-PEG	1,2-dimirisztoil-rac-glicero-3-metoxi-polietilén-glikol
DSPC	1,2-disztearil-sn-glicero-3-foszfo-kolin
ECM	endoteliális sejtenyésztő tápfolyadék
EPO	eritropoetin
FBS	borjúsavó
GFP	zöld fluoreszcens fehérje
hEC	humán endotélsejt
HeLa	humán cervikális karcinóma eredetű sejtvonal
KLF2	Kruppel-szerű faktor 2
LNP	lipid nanopartikulum
mRNS	hírvivő RNS
NPC2	Niemann-Pick C2 fehérje
PBS	foszfát-pufferes sóoldat
PDI	polidiszperzitási index
PEG	polietilén-glikol
VEGF165	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor 165

1. BEVEZETÉS

1.1. A vér-agy gát, mint biológiai gátrendszer

A vér-agy gát a szervezet létfontosságú védelmi rendszereinek egyike, mely speciális szerkezetéből adódóan elválasztja egymástól a központi idegrendszert és a keringést, azok között dinamikus határfelületet alkot (Abbott és mtsai, 2006). Elsődleges feladata az agy és a vér között történő anyagáramlás szabályozása, az agyszövet tápanyagellátásának biztosítása és az alapvető homeosztázis fenntartása. Az agyi mikroerek falát szorosan kapcsolódó endotélsejtek építik fel. Az endotélsejtek közös bazális membránon osztoznak a pericitákkal, ezeket pedig az agy felőli oldalon az asztrocita sejtek burkolják be végtalpaikkal (1. ábra). A vér-agy gát működését a perivaszkuláris mikroglia sejtek, oligodendrociták, illetve a neuronok is befolyásolják. Ezek a sejtípusok egymással egy nagyobb egységet alkotnak, amelyet neurovaszkuláris egységnek nevezünk (1. ábra).

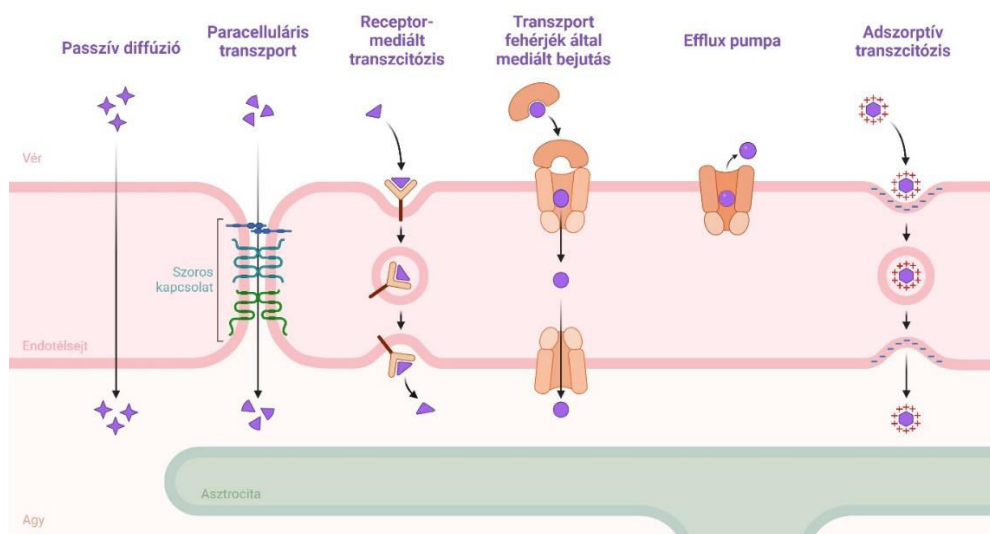


1. ábra. A neurovaszkuláris egység és a vér-agy gátat felépítő sejtek keresztmetszeti képe.
(Az ábra a biorender.com segítségével készült.)

Az agyi kapillárisok endotélsejtjeinek luminális felszínét egy negatív töltésű réteg, az úgynevezett glikokálix borítja (Johansson, 2001). Ez a réteg proteoglikánokból, szulfatált mukopoliszacharidokból, szulfatált és szialinsavat tartalmazó glikoproteinekből, illetve

glikolipidekből áll (Hervé és mtsai., 2008). Az endotélsejtek plazmamembránjában található negatív töltésű lipidek fejcsoportjai szintén hozzájárulnak ehhez a védőréteghez, amely szerepet játszik a töltéssel rendelkező gyógyszermolekulák agyba való bejutásának szabályozásában (Ribeiro és mtsai., 2012).

Az endotélsejtek közötti szabad anyagáramlást a szoros kapcsolatokat létrehozó fehérjék gátolják. Ilyen sejtkapcsoló transzmembrán fehérje az okkludin, a klaudinok, a junkciós adhéziós molekulák és a tricellulin. A klaudin és okkludin fehérjéket a zonula occludens fehérjék (ZO-1, ZO-2 és ZO-3) kapcsolják a sejtek aktin citoszkeletonjához (Abbott és mtsai, 2010). Ezek a kapcsolófehérjék képezik az agyi endotélsejtek rétegében azt a fizikai gátat, amely megakadályozza a sejtek, a vízdékony molekulák és az ionok szabad átjutását is a sejtek közötti térbe. Az efflux pumpák által létrehozott kémiai védelmi rendszerrel együtt ez a fizikai gát akadályozza meg a legtöbb új gyógyszerhatóanyag vér-agy gáton való átjutását. (Pardridge, 2001; Daneman és Prat, 2015) (2. ábra).



2. ábra. A vér-agy gát főbb transzport mechanizmusainak sematikus ábrázolása (Campos-Bedolla és mtsai., 2014 alapján). (Az ábra a biorender.com segítségével készült.)

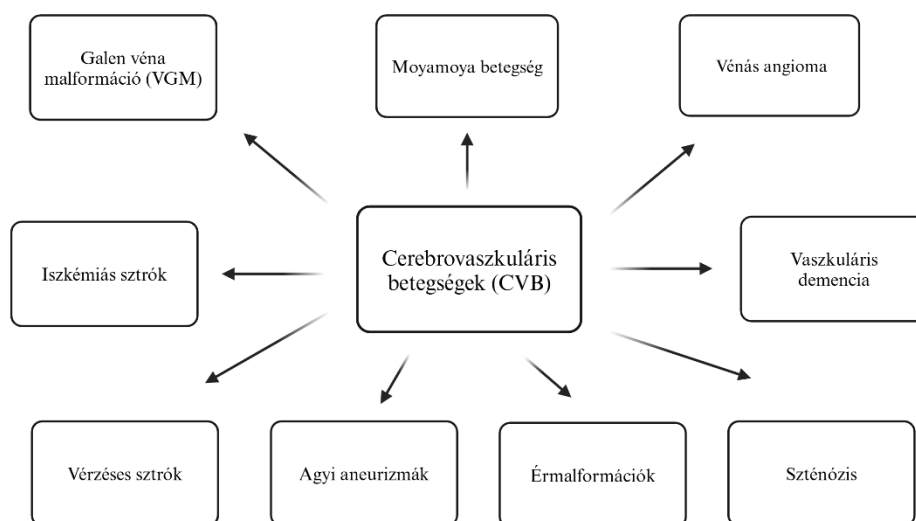
A vér-agy gát transzportútvonalai együttesen szabályozzák, hogy milyen anyagok és milyen módon juthatnak át a sejtek rétegén, biztosítva ezzel az agyszövet megfelelő védelmét és tápanyagellátását. A kismólsúlyú, lipofil, zsírban oldódó anyagok passzív diffúzióval közvetlenül az agyi endotélsejtek lipidmembránján keresztül jutnak be a sejtekbe (2. ábra). Az agyi endotélsejtek közötti, paracelluláris transzport a szoros sejtkapcsolatok fehérjéi által

szorosan szabályozott. A sejteken keresztüli, transzcelluláris transzportútvonalak egyike a receptor-mediált transzcitózis, mely során specifikus receptorok segítségével peptidek és fehérjék jutnak be az agyba (2. ábra). Az agy számára fontos tápanyagok egy részét az endotélsejtek specifikus transzportfehérjei (solute carriers, SLC) szállítják az agyi sejtekhez, például a különböző aminosavakat és a glükózt. Az endotélsejtek felszínén található negatív töltésű glikokálxhoz kötődni képes pozitív töltésű molekulák adszorptív transzcitózissal juthatnak át a vér-agy gáton (Campos-Bedolla és mtsai., 2014) (2. ábra).

1.2. A vér-agy gát sérülése központi idegrendszeri betegségekben

A különböző központi idegrendszeri betegségek, mint például neurodegeneratív betegségek (Alzheimer-kór, Parkinson-kór, amyotrófiás laterálszklerózis (ALS), Huntington-kór), neurovaszkuláris kórképek (ischaemiás stroke, agyi aneurizma, 3. ábra), agyi fertőzések, (agyhártyagyulladás, agyvelőgyulladás) agydaganatok (glioblasztóma), epilepszia kezelésének egyik legnagyobb akadálya a vér-agy gát, amely megnehezíti a terápiás molekulák bejutását az agyba. A szorosan záródó és szigorúan szabályozott vér-agy gát megakadályozza a nagy terápiás molekulák és gyógyszerhatóanyagok áthaladását, így nagyban korlátozza az idegrendszeri betegségek hatékony gyógyítását. Jól ismert ugyanakkor, hogy a vér-agy gát sejtjei és ezáltal annak működése is sérül a központi idegrendszeri betegségekben. A szoros sejtkapcsoló struktúrák megváltozása, a transzportfehérjék és az endocitotikus transzport mechanizmusok módosulása következtében létrejövő permeabilitás növekedés számos agyi betegség esetében megfigyelhető (Abdullahi és mtsai., 2018; Andjelkovic és mtsai 2020).

Az utóbbi években a nanotechnológia és a géntechnológia robbanásszerű fejlődése lehetővé tette olyan technikák kifejlesztését, mely során terápiásan hasznos fehérjék génjeit, vagy RNS-t juttathatunk be a sejtekbe, amely új lehetőségeket nyitott meg a központi idegrendszert érintő betegségek terápiájában is (Burkhart és mtsai., 2017, Hede és mtsai. 2020, Karikó, 2021).

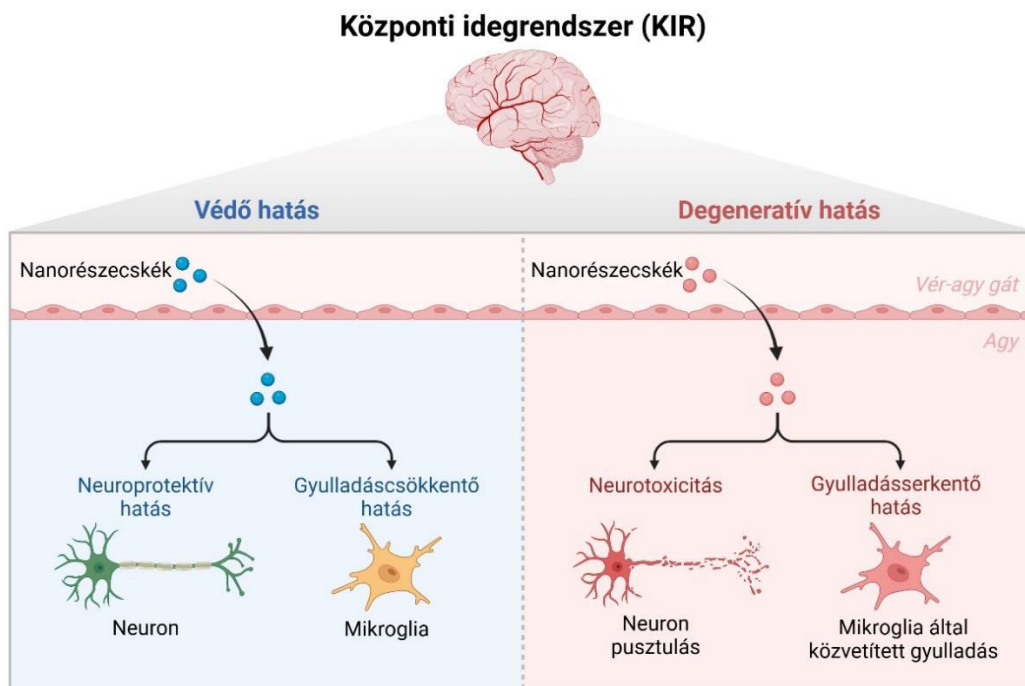


3. ábra. A cerebrovaszkuláris betegségek főbb típusai. (V. Andjelkovic és mtsai., 2020 alapján)

1.3. Nanorészecskék

A gyógyszerhatóanyagok, illetve gének vagy genetikai anyagok célzott nanorészecskébe csomagolása és a részecskék vér-agy gáton való átjuttatása egy ígéretes új módszer a központi idegrendszert érintő betegségek kezelésében. A nanotechnológia gyors fejlődése lehetővé tette a különböző nanorészecskék kifejlesztését, amelyek különböző szerves és szervetlen anyagokból is felépülhetnek. A szerves nanorészecskék, például a lipid alapú rendszerek, gyakran biokompatibilisek és kevésbé immunogének, így előnyösek a terápiás alkalmazások szempontjából (Khare és mtsai., 2023). Ezzel szemben a szervetlen nanorészecskék, mint például az arany, vas-oxid, vagy a szilícium-dioxid részecskék, fokozott stabilitást és különleges optikai tulajdonságokat kínálnak, ami lehetővé teszi azok diagnosztikai felhasználását. A nanorészecskék anyaga, mérete, felületi töltése, kémiai tulajdonságai és célzó molekulákkal történő összekapcsolása nagyban befolyásolhatja a szöveti eloszlásukat és agyba való bejutásukat, ami különösen fontos a hatékony terápia szempontjából. Szervetlen nanorészecskéket gyakran alkalmaznak az orvosi képalkotásban, míg a szerves nanorészecskéket elsősorban gyógyszer szállításra és génterápiára fejlesztik (Male és mtsai., 2022). A vér-agy gáton átjutva ezek a részecskék célzott terápiás hatást fejthetnek ki, ugyanakkor a nanorészecskék előállítására gondos tervezést igényel, mert az összetételük,

méretük és a szervezet biológiai válasza függvényében káros (degeneratív) hatásokat is kiválthatnak (4. ábra).

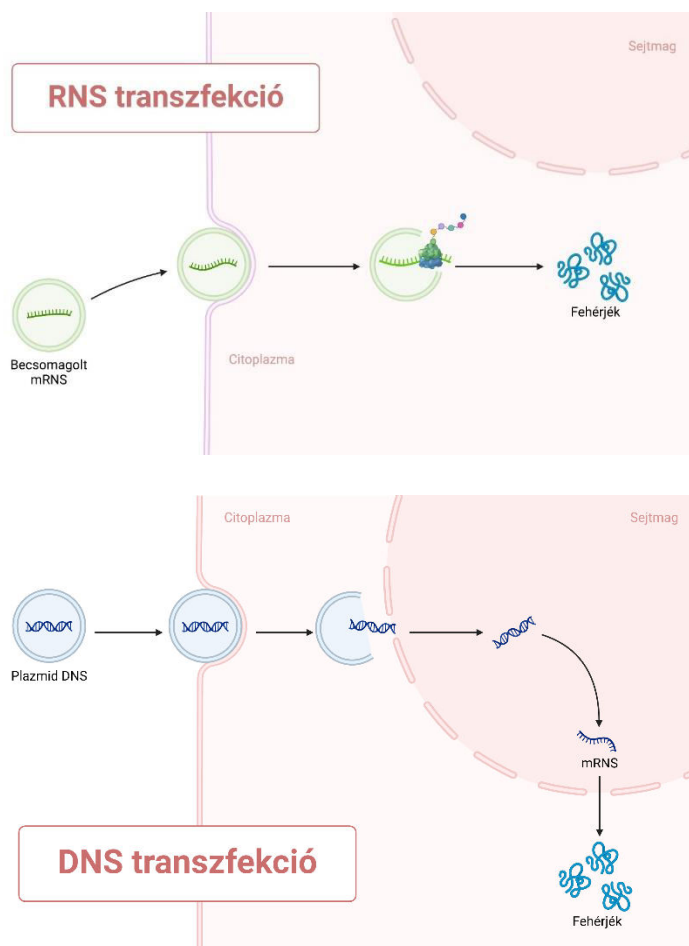


4. ábra. Nanorészecskék potenciális hatásmechanizmusai az agyban. (Az ábra a biorender.com segítségével készült.)

1.4. Génbevitel (transzfekció)

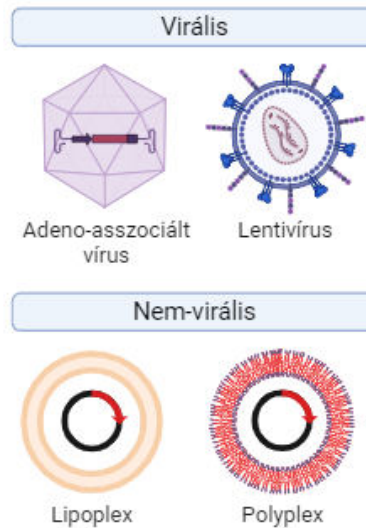
A transzfektálás során a célmolekulák, DNS, RNS, vagy CRISPR-komponensek speciális vektorok segítségével kerülnek be a célsejtekbe, hogy megváltoztassák a génexpressziót vagy célzott genetikai módosításokat végezzenek (Zhang és mtsai. 2021). A folyamat különböző lépésekből áll, amelyek közül az első a vektor és a sejtek közötti interakció, amely lehetővé teszi a genetikai anyag bejuttatását a sejtbe. A sejtek kezelése során, a vektor először a sejtfelszínhez kötődik, majd endocitózissal vagy közvetlen membránfúzióval bejut a sejtekbe. A genetikai anyag a sejten belül endoszómákba záródik, majd különféle mechanizmusok révén kiszabadul belőle. Ez a lépés kritikus, mivel az endoszómából való kiszabadulás nélkül az anyag lebomolhat, mielőtt elérné a célhelyet (Samaridou és mtsai., 2020). Miután a genetikai anyag kiszabadult az endoszómából, megkezdődik mRNS transzfekció esetén az mRNS átírása a riboszómákban, vagy a bejuttatott DNS beépülhet a sejtmagba és aktiválhatja a kívánt géneket, például CRISPR esetén a Cas9 fehérje aktiválásával specifikus génszerkesztést hajthat végre (5. ábra). Amikor a sejt osztódik, a sejtmag membránja lebomlik, így a bevitt DNS

szabadabban elérheti a sejtmagot. A már nem osztódó, alacsony mitotikus aktivitást mutató sejtek esetében azonban a génexpressziós mechanizmusok alacsonyabbak, ebben a kevésbé dinamikus állapotban a transzfektáló ágens felvétele is kisebb, ezáltal a terápiás gének bejuttatási hatékonysága is jelentősen lecsökken (Hede és mtsai. 2019).



5.ábra. Az RNS és DNS transzfektálás folyamatának sematikus ábrázolása. (Az ábrák a biorender.com segítségével készültek.)

A transzfektálás alapvető eszközei a virális és nem virális vektorok, amelyek lehetővé teszik a terápiás genetikai anyagok sejtbe való juttatását (6. ábra). A virális vektorok, mint az adenovírus és az adeno-asszociált vírus (AAV), magas transzfektálási hatékonyságot biztosítanak, de immunogenitásuk és potenciális genotoxicitásuk miatt kockázatosak lehetnek. Nem virális vektorok közé tartoznak a lipid vagy polimer alapú nanorészecskék, melyek kevesebb immunológiai reakciót váltanak ki és biztonságosabbnak tekinthetők, bár hatékonyságuk gyakran alacsonyabb (Zhang és mtsai. 2021) (6.ábra).



6. ábra Virális és nem virális hordozók. (Az ábra a biorender.com segítségével készült.)

1.5. A lipid nanorészecskék (LNP) jelentősége a transzfektálásban

Az utóbbi időben főleg a COVID-19 mRNA alapú vakcináknak köszönhetően a nem virális vektorok közül a lipid nanorészecskék (LNP), egyre nagyobb figyelmet kaptak, mivel lehetőséget kínálnak a magas transzfektálási hatékonyság és biztonságos célhelyre juttatás kombinálására (Marcos-Contreras és mtsai. 2020, Zak és mtsai. 2021).

Az LNP-k hatékony eszközként szolgálnak különböző terápiás molekulák, például mRNA, siRNA, CRISPR-Cas9 rendszerek és oligonukleotidok célzott sejtbe szállítására (Zhang és mtsai. 2021, Karikó 2021). A lipid alapú rendszerek kiváló stabilitással rendelkeznek, és biokompatibilitásuk miatt minimális immunválaszt váltanak ki, és kontrolláltabb felszabadulást tesznek lehetővé, ezáltal csökkenthetőek a mellékhatások okozta egészségügyi kockázatok. Az LNP-k szerkezete és kémiai összetétele lehetővé teszi azok alkalmazását különböző célterületeken, mint például a központi idegrendszer. Méretük és felületi töltésük meghatározó szerepet játszik abban, hogy át tudnak-e hatolni a vér-agy gáton és hatékonyan bejuttathatók-e az endotélsejtekbe. Képesek megvédeni a szállított mRNA-t a gyors lebomlástól és segíteni a citoplazmába való bejutását. A LNP-kezt felépítő pozitív töltésű lipidek lehetővé teszik a negatív töltésű mRNA szállítását, valamint kölcsönhatásba tudnak lépni a sejtmembrán negatív töltésű foszfolipidjeivel, ezáltal elősegítve a sejtbejutást. A sejtben belüli transzport során a kationos lipidek képesek arra, hogy az endoszómába jutva a savas közeg hatására destabilizálják az endoszóma membránját úgy, hogy kölcsönhatásba lépnek a savas környezetben felhalmozódó

protonokkal, így megváltoztatják a lipidstruktúrát és így a transzfektáló ágens ki tud szabadulni az LNP-kból a citoplazmába (Samaridou és mtsai., 2020; Sakurai és mtsai., 2022).

Zak és munkatársai (2021) koleszterint és PEG-et tartalmazó kationos és ionizálható LNP-ket vizsgáltak különösen szervspecifikus mRNS szállítás céljából. Megállapították, hogy a részecskék töltésének és összetevőinek optimalizációjával azok specifikus szövetekbe juttathatók. Azt találták, hogy az ionizálható LNP-k kevésbé toxikusak, mint az állandóan kationos részecskék. Az ionizálható LNP-k felületi töltése pH függő módon változik, tehát képesek lesznek megváltoztatni töltésüket annak függvényében, hogy milyen környezetben vannak, így semleges pH-n semleges töltést mutatnak, a savas kémhatású endoszómában pedig pozitív töltésűvé válnak, így segítik a membránon való átjutást és a szállított anyag kijutását a citoplazmába.

Az utóbbi években az LNP-ket sikeresen alkalmazták mRNS vakcinákban, és ígéretes eredményeket mutattak a génterápia területén, különösen olyan betegségek esetében, ahol a gyors fehérjeszintézis kritikus (Karikó 2021; Zak és mtsai., 2021). Az mRNS-terápiák és az LNP-technológia fejlődése hosszú távú potenciált rejt mind a központi idegrendszert érintő betegségek kezelésében, mind pedig a genetikai, onkológiai és fertőző betegségek terápiájában.

1.6. Az endotélsejtek transzfektálhatósága

Az endotélsejtek transzfektálása nagy kihívást jelent, különösen a vér-agy gát esetében az agyi endotélsejtek szorosan illeszkedő, konfluens rétege erős gátat képez a vektorok bejutásával szemben. Számos kutatócsoport vizsgálja, hogy az endotélsejtek transzfektálásával és genetikai módosításával lehet-e hatékony fehérjeszekréciót elérni a vér-agy gát sérülése nélkül.

Campbell és kutatócsoportja (2012) kimutatták, hogy a vér-agy gát ideiglenes és szelektív paracelluláris megnyitásával csökkenteni lehet a traumás agysérülés során fellépő cerebrális ödémát és javítani a kognitív funkciókat a sérülés után. A szoros sejtkapcsoló fehérjék közé tartozó claudin-5 expressziójának siRNS általi csökkentésével jelentősen mérséklődött az agysérülés okozta duzzanat. A vér-agy gát strukturális módosítása pedig csak ideiglenes volt, 72 óra után visszaállt az eredeti állapotra (Campbell és mtsai., 2012).

1.7. HeLa sejtvonala

A HeLa sejtvonala az egyik legismertebb és leggyakrabban használt humán sejtvonala a biológiai és orvosi kutatásokban. 1951-ben izolálták Henrietta Lacks méhnyakrákos sejtjeiből, és azóta folyamatosan osztódó sejt kultúráként használják a világ minden részén. A tumoros eredetű, gyorsan osztódó HeLa sejtek az endotélsejtekkel szemben sokkal könnyebben transzfektálhatók, mely tulajdonságuk megkönnyíti a transzfekciós technikák tesztelését és optimalizálását. Számos endotélsejt transzfekcióját vizsgáló tanulmány is felhasználja a HeLa sejt vonalat, mint könnyen transzfektálható sejtmodellt. Hede és munkatársai (2019) például HeLa sejteken 75%-os transzfekciós hatékonyságot értek el, míg agyi kapilláris endotélsejt esetében ez nagyságrendekkel alacsonyabb volt.

2. CÉLKITŰZÉSEK

A vér-agy gát speciális endotélsejtjei szoros sejtkapcsolatokkal rendelkeznek, amelyek korlátozzák a nagyobb molekulák és transzfektáló ágensek bejutását az agyszövetbe. Ez különösen nagy kihívást jelent a központi idegrendszert célzó génterápiák számára, mivel a transzfektálás nehézkessé válik ezekben a sejtekben. Az agyi endotélsejtek transzfektálása mégis kiemelt jelentőségű, mely lehetővé teheti, hogy a sejteken keresztül olyan terápiás géneket juttassunk be az agyszövetbe, amelyek különféle központi idegrendszert érintő betegségek kezelésére szolgálhatnak. A transzfektálással az endotélsejtek képesek lehetnek terápiás fehérjék termelésére, amelyek agyba történő szekréciójával elősegíthetik ezen betegségek gyógyítását.

Az LNP-k a nem-virális génterápia egyik ígéretes eszközei, mivel képesek nagy hatékonysággal genetikai anyagot szállítani, miközben minimalizálják az immunválaszt és a citotoxicitást.

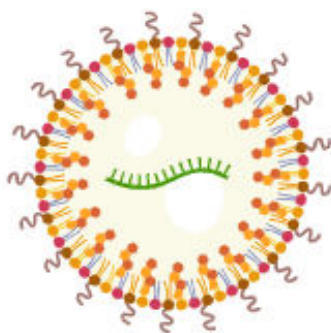
Ezek alapján célul tűztük ki, hogy megvizsgáljuk

- az előállított LNP-k fiziko-kémiai tulajdonságait (méret, töltés, mRNS töltet koncentrációja),
- az LNP-k és a stabilitásukat szolgáló szukróz hatását az agyi endotélsejtek életképességére,
- az LNP-k sejtfelvételét HeLa és hEC sejtekbe,
- a transzfektáció hatékonyságának változását a nem konfluens és konfluens HeLa és hEC sejtenyészetekben.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. LNP-k előállítása

Az LNP-ket a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Molekuláris Stresszbiológiai Laboratóriumában állítottuk elő együttműködő partnereink segítségével standard protokollok alapján (7. ábra). A lipidek keveréke 50 mol% KA92, 10 mol% DSPC (1,2-disztearil-sn-glicero-3-foszfo-kolin), 38,5 mol% koleszterin és 1,5 mol% DMG-PEG (1,2-dimirisztoil-rac-glicero-3-metoxi-polietilén-glikol) volt, amelyeket etanolban oldottunk fel. A nanorészecskék előállítása során zöld fluoreszcens protein (GFP) módosított mRNS-t használtunk töltetnek. A lipid tartalmú szerves fázist módosított mRNS-t tartalmazó vizes fázissal (276 µg/ml) egy mikrofluidikai eszköz segítségével kevertük össze. A keveréket egy éjszakán át dializáltuk foszfát pufferben (Visking dialízis cső, MWCO 12 000-14 000 RC, átmérő: 6 mm). A végső LNP oldatokhoz 20 v/v% szukrózt adtunk, majd -80 °C-on tároltuk a felhasználásig.

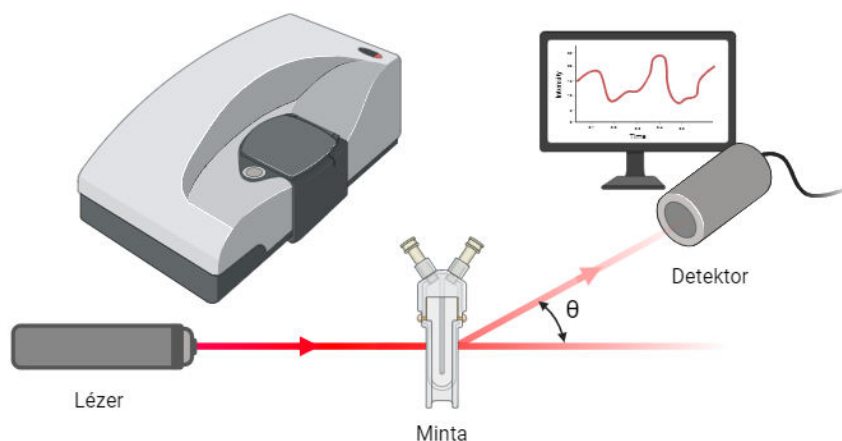


7. **ábra.** Sematikus ábra: mRNS töltetű szolid lipid nanopartikulum (LNP) pegilált külső membránnal. (Az ábra a biorender.com segítségével készült.)

3.2. LNP-k jellemzése

Az LNP-k méretét, polidiszperzitási indexét (PDI) és felületi töltését (zéta potenciál) dinamikus fényszórás elvén működő műszerrel (Malvern Zetasizer Nano ZS, UK) mértük meg (8. ábra). A dinamikus fényszórásmérés (DLS) során a vizsgált oldatban lévő részecskékről szórt lézerfény intenzitásának időbeli változását mérjük. A lézerrel megvilágított mintában a részecskékről szóródó fényt egy detektor rögzíti, amely az intenzitás ingadozásait elemzi. A minta mérését egy átlátszó kapilláris küvettában végezzük. Az intenzitás fluktuációi alapján következtethetünk a részecskék méretére. Az átlagértékeket mintánként legalább 3×13 mérések

alapján számítottuk ki. A részecskék fiziko-kémiai paramétereit a minták felolvasztása után (a sejtes kísérletek előtt) mértük steril PBS-ben, 50%-os hígítással. A mintákban található mRNS mennyiségét Qubit RNA HS assay segítségével határoztuk meg.

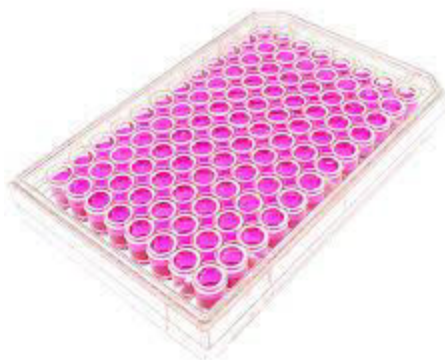


8. ábra. Zetasizer Nano ZS készülék (Malvern Pananalytical). Adott θ (théta) szórási szög, amely az eredeti beeső lézersugár és a detektor által rögzített szórt fény iránya közötti szög. (Az ábra a biorender.com segítségével készült.)

3.3. Sejttenyésztés

A sejttenyésztéshez humán őssejt eredetű endoteliális sejteket (hEC) használtunk, melyek köldökzsínórvér hematopoetikus CD34⁺ őssejteiből, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor 165 (VEGF165) segítségével történő differenciálással lettek előállítva egy 15-20 napos protokoll alapján. A VEGF165 fontos szerepet játszik az érképződés (angiogenezis) folyamatában, ezzel az endotélsejtek kialakításában. Az őssejtek izolálását emberi köldökzsínórvérből a Francia Felsőoktatási és Kutatási Minisztérium etikai engedélyével (CODECOH szám: DC2011-1321) és a Nemzetközi Orvosi Szövetség Helsinki Nyilatkozatának megfelelően végezték. A sejteket IV-es típusú kollagén és fibronectin elegyével bevont 96-lyukú lemezekre szélesztettük ki és endotél sejt kultúra médiumban tartottuk (ScienCell, 5% FBS, 1% endoteliális sejtnövekedési kiegészítő, 50 mg/ml gentamicin). A hEC sejteket borjú agyi pericita kondicionált médiummal differenciáltattuk a vér-agy gát tulajdonságok kialakítása érdekében (Cecchelli és mtsai., 2014, Santa-Maria és mtsai., 2021).

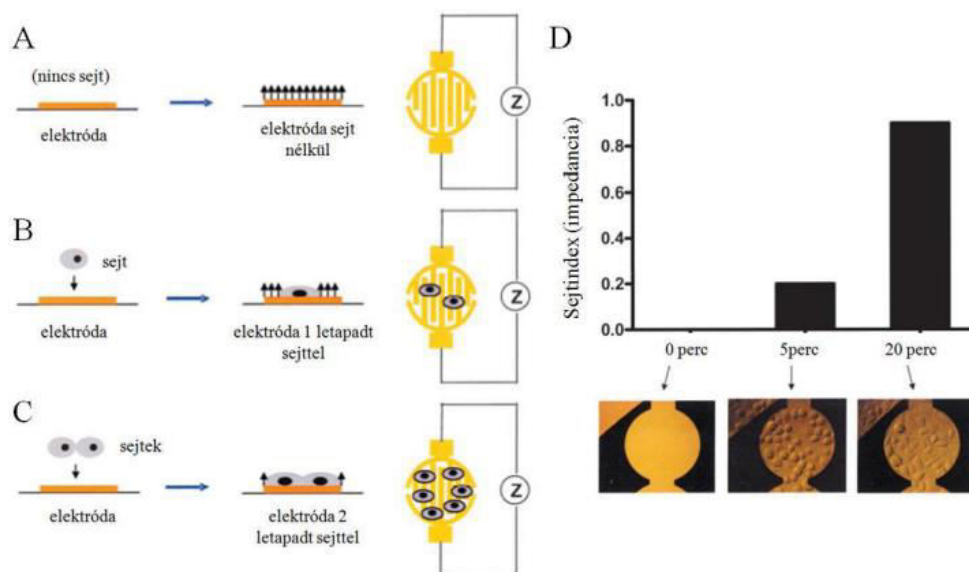
A hEC sejtek mellett humán cervikális karcinóma sejteket (HeLa, ATCC CCL-2, P21) is használtunk a GFP mRNS-t tartalmazó LNP-k vizsgálatára, melyekhez a 96-lyukú tenyésztőlemezeket patkányfarok kollagén és steril desztillált víz 19:1 arányú keverékével vontuk be, a sejteket pedig 10% borjú szérummal (FBS) kiegészített Minimum Essential tápfolyadékban (MEM) tenyésztettük (9. ábra).



9. ábra. Sejttenyésztő lemez

3.4. Sejtek életképességének vizsgálata

A hEC sejtek életképességét impedancia méréssel (RTCA-SP, Agilent Technologies) követtük 10 kHz-en. A valós idejű sejtanalízis egy olyan nem invazív módszer, amely lehetővé teszi a sejtek viselkedésének nyomon követését élő sejt kultúrákban (10. ábra). A sejteket speciális, arany elektródákkal ellátott 96 lyukú lemezekre tenyésztjük. Ezek az elektródák érzékelik a sejtek letapadása által okozott elektromos impedancia változásokat. Amikor a sejtek növekednek, osztódnak vagy valamilyen károsodást szenvednek megváltozik a morfológiájuk, az impedancia megváltozik, amelyet a rendszer folyamatosan rögzít. A háttér mérésekhez 50 μ l sejttenyésztő tápfolyadékot adtunk a lyukakba, majd a sejteket 6×10^3 sejt/lyuk sűrűségben szélesztettük a IV típusú kollagénnel (100 μ g/ml) és fibronectinnel (25 μ g/ml) bevont, integrált arany elektródákkal ellátott 96 lyukú lemezekre (E-plate 96, Agilent Technologies). A sejteket 4 napig tenyésztettük és a kísérletek végéig 5 percenként monitoroztuk. A növekedés platófázisának kezdetén a sejteket 24 órán keresztül LNP-kkel (mRNS tartalom: 40-880 ng/ml) vagy szukrózzal (0,05-1,2 mM) kezeltük, utóbbi az LNP-k biztonságos tárolásához és stabilitásához szükséges. A sejtindexet $R_n - R_b$ értéként határoztuk meg minden egyes mérési időpontban, ahol R_n a lyuk sejt-elektroda impedanciája, amikor a lyuk sejteket tartalmaz, és R_b a lyuk háttér impedanciája.



10. ábra. Impedancia méréssel történő valós idejű sejtanálízis (Solly és mtsai, 2004).

A, B, C ábrák mutatják a sejtek letapadását, melyeket az elektródák érzékelnek, D ábrán látható az impedancia (Y tengely) az idő (X tengely) függvényében.

3.5. LNP-k sejtfelvételi vizsgálata

Az lipid nanopartikulumokba zárt GFP mRNS-ének HeLa és hEC sejtek általi sejtfelvételi kinetikáját egy nagy teljesítményű lemezképző rendszerrel (Operetta, PerkinElmer) vizsgáltuk meg (11. ábra). A sejteket patkányfarok kollagénnel bevont, fekete, átlátszó aljú, 96 lyukú lemezekre tenyésztettük. A szubkonfluencia eléréséhez 1×10^3 sejt/lyuk sejtkultúrát használtunk, és 5×10^3 sejt/lyuk arányban szélesztettük a sejteket a konfluens tenyészetek eléréséhez. A hEC sejtek esetén IV-es típusú kollagénnel és fibronectinnel bevont lemezeket használtunk. Két napos tenyésztés után sejtmagfestéket (Hoechst 33342, 1:1000) adtunk a sejtekhez 20 percre, majd a festéket eltávolítottuk és a sejteket GFP mRNS-t (50-1600 ng/mL) tartalmazó LNP-kkel kezeltük. A nanorészecskék hígítását a sejtek tenyésztéséhez használt tápfolyadékban végeztük. A letapadt sejtek számának és pozíciójának meghatározásához a magfestést használtuk. A transzlált GFP fehérje fluoreszcens intenzitását óránként rögzített képekkel monitoroztuk 48 órán keresztül.



11. ábra. Fluoreszcens képalkotó műszer (Operetta, PerkinElmer).

3.6. Statisztikai elemzés

Az adatokat statisztikai elemzés céljából átlag $\pm$ SD (szórás) formában elemeztük, amely lehetővé teszi az átlagos értékek és a variabilitás mértékének áttekintését. A csoportok közötti különbségek értékeléséhez egy- vagy kétutas varianciaanalízist (ANOVA) alkalmaztunk, majd ezt követően Bonferroni-tesztet használtunk a csoportok közötti szignifikáns különbségek meghatározására. Az adatok elemzését a GraphPad Prism 8.0 szoftver segítségével végeztük. Az eredményeket szignifikánsnak tekintettük, ha a $p < 0,05$ értékeket kaptunk. Minden kísérletet legalább háromszor megismételtünk, kísérletenként 5-16 párhuzamos mintával dolgoztunk.

4. EREDMÉNYEK

4.1. LNP-k karakterizálása

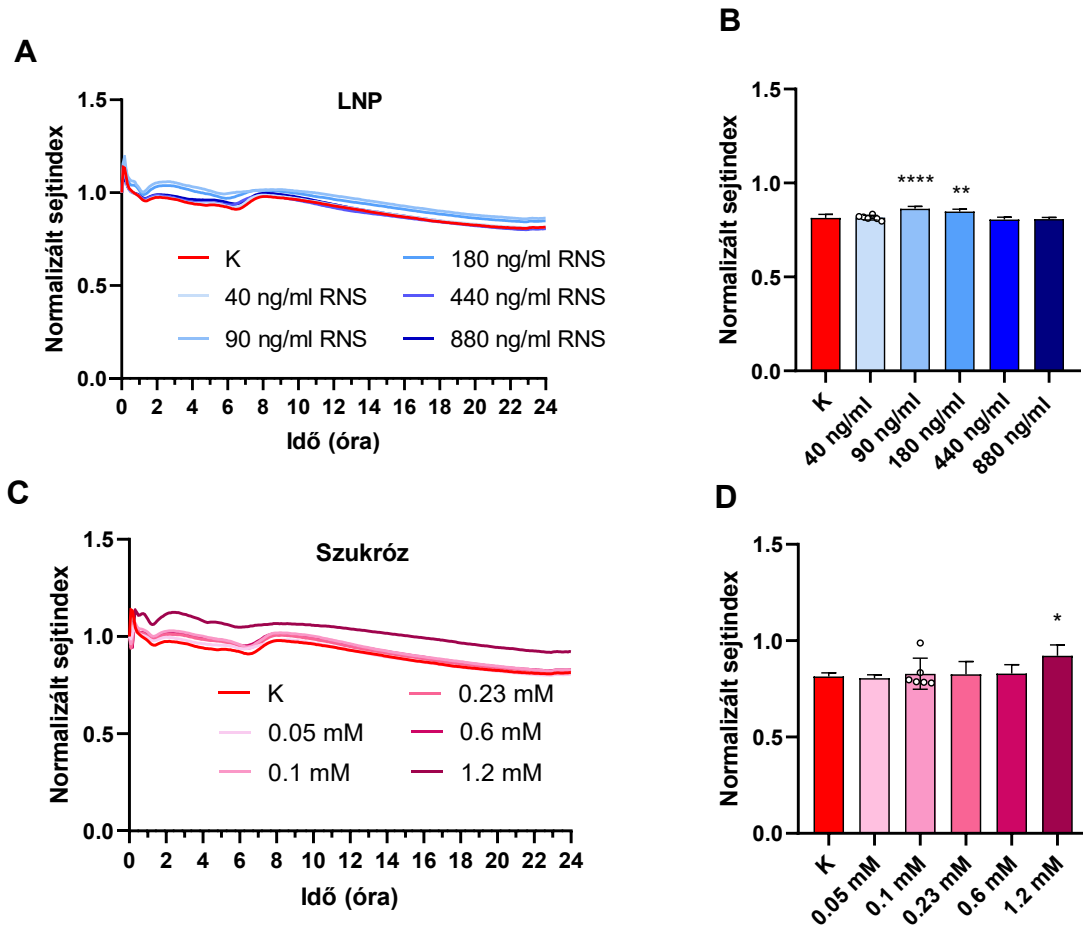
Az elkészített LNP-k töltetének meghatározása során a nanopartikulumokba zárt GFP-t kódoló mRNS- koncentrációja 276 $\mu\text{g/ml}$ volt (1. táblázta). A részecskék átlagos átmérője $93,08 \pm 0,46$ nm volt. Polidiszperzitási index értékük alacsony volt ($0,08 \pm 0,03$), amely arra utal, hogy az LNP-k méreteloszlása a mintában egyenletes, nem voltak nagyobb aggregátumok. A részecskék kismértékű pozitív felületi töltéssel ($8,79 \pm 0,4$ mV) rendelkeztek (1. táblázat).

LNP	
mRNS tartalom ($\mu\text{g/ml}$)	276
Átmérő (nm)	$93,08 \pm 0,46$
Polidiszperzitási index	$0,08 \pm 0,03$
Zéta potenciál (mV)	$8,79 \pm 0,4$

1. Táblázat. A lipid nanorészecskék főbb fiziko-kémiai tulajdonságai.

4.2. LNP-k hatása a sejtek életképességre

Annak érdekében, hogy meghatározzuk az LNP-k biztonságosan alkalmazható koncentrációját a további kísérletekhez, megvizsgáltuk a különböző koncentrációjú LNP kezelési csoportok, és a hozzájuk tartozó, a tárolásukhoz szükséges szukróz koncentrációk hatását a hEC sejtek életképességére (12. A, D ábra). A vizsgált koncentrációtartományban 24 órán át megfigyelve egyik LNP (12. A, B ábra) és szukróz koncentráció (12. C, D ábra) sem csökkentette az hEC sejtek életképességét a kontroll csoporthoz képest, sőt néhány koncentráció érték mellett még sejindex növekedést is tapasztaltunk. Eredményeink alapján tehát minden vizsgált koncentrációtartományban biztonságosan alkalmazhatók az LNP-k a további sejtfelvételi kísérletekben.

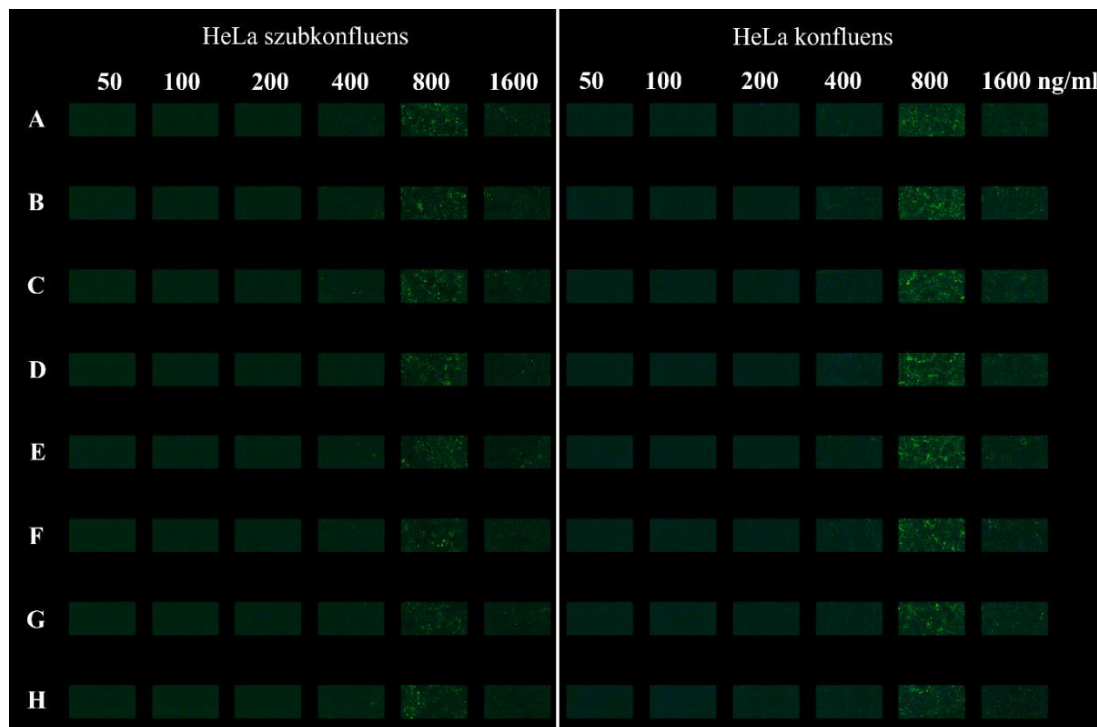


12. ábra. Az LNP-k (A) és az adott LNP csoportokhoz tartozó szukróz mennyiségekre (C) adott sejtválaszok kinetikája a hEC sejtek életképességére 24 óráig tartó monitorozás alatt. A sejtek életképessége a 24 órás kezelés végpontjában a különböző koncentrációjú LNP (B) és ennek megfelelő szukróz (D) kezelést követően. Statisztikai elemzés: egyutas ANOVA, majd Bonferroni-posztteszt, * $P < 0,05$, ** $P < 0,01$ a tápfolyadékkal kezelt kontroll csoporthoz (K) képest, $n = 6$.

4.3. LNP-k felvétele HeLa sejtekbe: vizualizáció

Az 50-1600 ng/ml GFP mRNS-t tartalmazó LNP-k sejtbefutását mind a szubkonfluens, mind a konfluens, tumoros eredetű és gyorsan osztódó HeLa sejtek esetében megvizsgáltuk 24 órás kezelést követően (13. ábra). A mikroszkópos képeket elemezve a fluoreszcencia intenzitásában a 800 ng/ml GFP mRNS tartalmazó LNP kezeléseket esetében láttunk szemmel is látható, jelentős zöld fluoreszcencia intenzitást, amely az LNP-k nagyarányú sejtbefutására és sikeres GFP sejtbeli kifejeződésére utal (13. ábra). Ez az emelkedett fluoreszcencia intenzitás

mind a subkonfluens mind pedig a konfluens tenyészetek esetében megfigyelhető volt. A legmagasabb koncentráció (1600 ng/ml) esetében viszont ez a GFP intenzitás visszaesett (13. ábra).

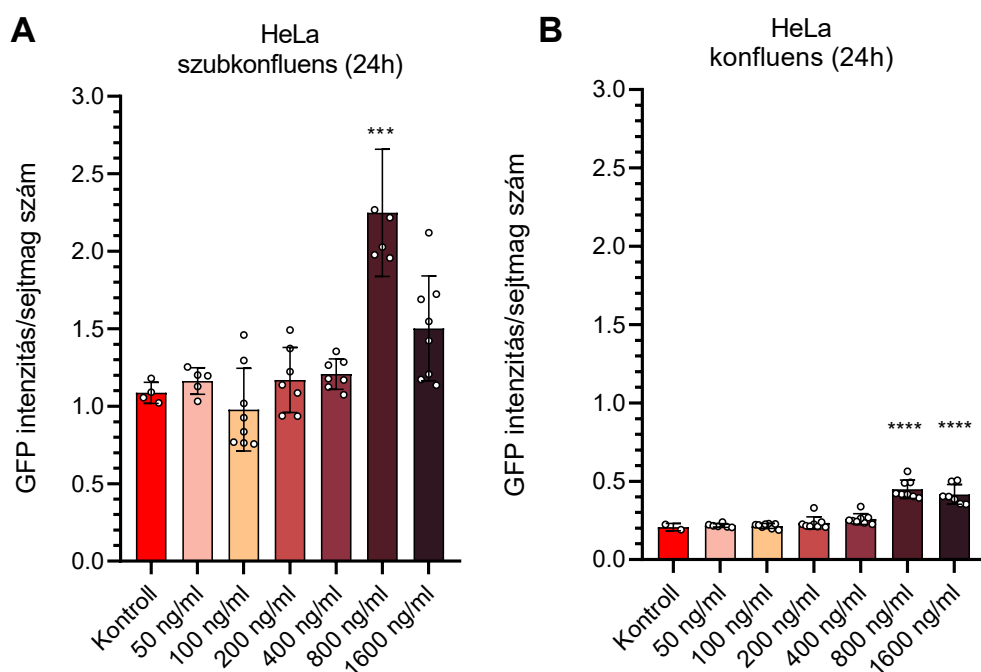


13. ábra. Sikeres fehérje expresszió kimutatása GFP mRNS-t tartalmazó LNP kezelt HeLa sejtekben 24 órás inkubációt követően, Operetta fluoreszcens mikroszkópos képalkotó technikával vizsgálva.

4.4. LNP-k felvétele HeLa sejtekbe: szubkonfluens és konfluens tenyészetek összehasonlítása

A HeLa sejtekben a GFP fluoreszcencia intenzitási adatokat elemeztük az adott sejtmag számokra normalizálva is 24 órás LNP inkubálást követően (14.A, B ábra). A szubkonfluens, azaz aktív osztódást mutató még nem teljesen összefüggő sejttenyészetek esetében a legnagyobb transzlációs hatékonyságot a 800 ng/ml mRNS-t tartalmazó LNP kezelési csoportokban figyeltük meg, ahogy az a mikroszkópos képeken is megfigyelhető volt (14.B ábra). A szubkonfluens tenyészetekkel összehasonlítva jól szembeötlő eltérés figyelhető meg a transzláció hatékonyságában a konfluens tenyészetek esetében, ahol az LNP kezelést egy már összefüggő HeLa sejttenyészetten végeztük el. A legnagyobb expresszió itt is a 800 és az 1600 ng/ml koncentrációk esetében volt megfigyelhető, de a transzlálódó GFP mennyisége egy

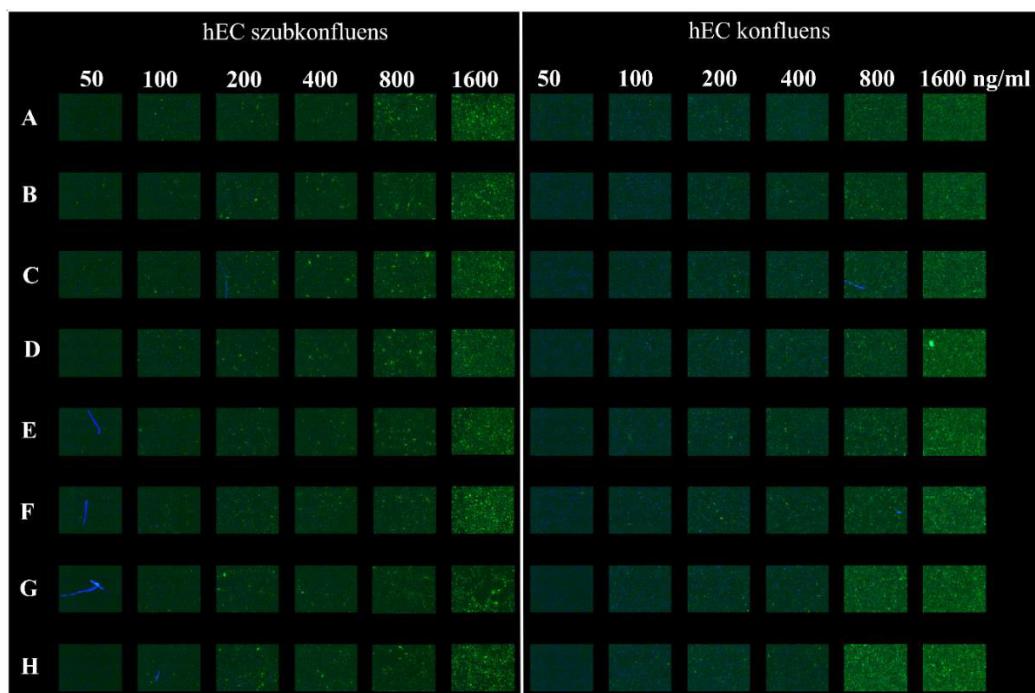
nagyságrenddel kisebbnek adódott ezekben a kezelési csoportokban (14.B ábra), a szubkonfluens tenyészetekkel összevetve (14.A ábra). A legjobbnak tekinthető 800 ng/ml kezelési csoportokat összehasonlítva a szubkonfluens HeLa sejtek 5,6-szor magasabb GFP fluoreszcencia intenzitást mutattak a konfluens tenyészetekkel összevetve, ami szignifikánsabban több LNP felvételre és/vagy hatékonyabb transzlációra utal.



14. ábra. Szubkonfluens (A) és konfluens (B) HeLa sejtenyészetek GFP fluoreszcencia intenzitása a sejtszámra normalizálva 24 órás LNP inkubációt követően. Statisztikai elemzés: egyutas ANOVA, majd Bonferroni-posztteszt, *** $P < 0,001$, **** $P < 0,0001$ a tápfolyadékkal kezelt kontroll csoporthoz képest, $n = 4-8$.

4.5. LNP-k felvétele hEC sejtekbe

A tumoros eredetű HeLa sejtekhez képest a lassabban növekedő humán agyi endotélsejtek szubkonfluens és konfluens sejtrétegeit is megvizsgáltuk 24 órás LNP kezelést (50-1600 ng/ml) követően fluoreszcens mikroszkóppal. A GFP fluoreszcencia intenzitásában kismértékű koncentrációfüggő növekedést figyeltünk meg mind a szubkonfluens mind pedig a konfluens tenyészetek esetében, és a legmagasabb fluoreszcencia intenzitást mindkét tenyészet esetében a legmagasabb, 1600 ng/ml mRNS koncentrációjú LNP kezelések esetében figyelhattunk meg mikroszkóposan (15. ábra).

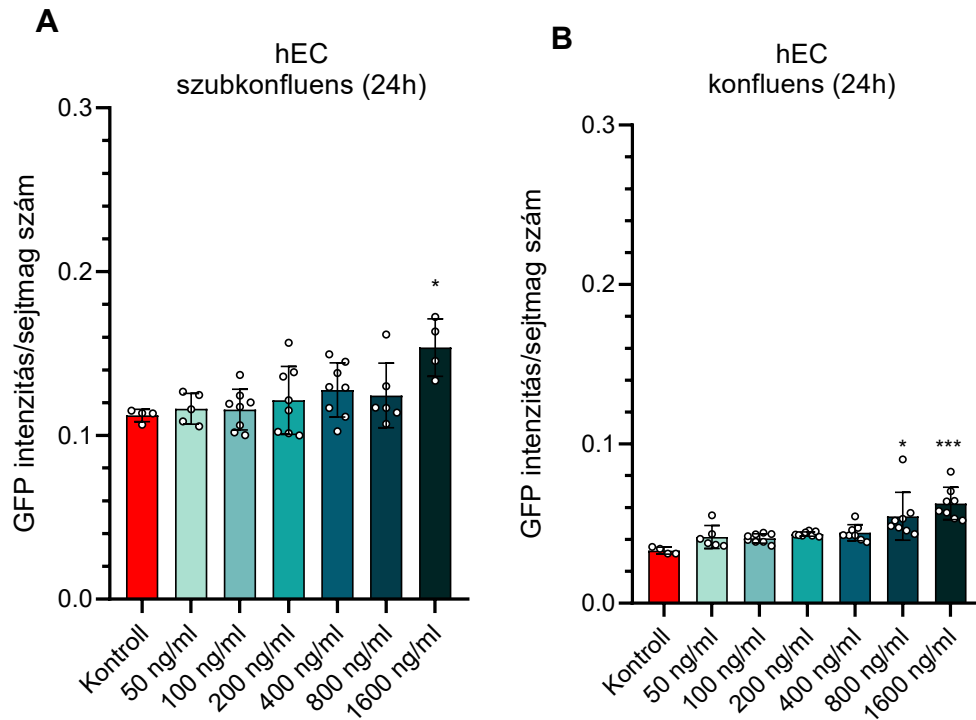


15. ábra. Sikeres fehérje expresszió kimutatása GFP mRNS-t tartalmazó LNP kezelt hEC sejtekben 24 órás inkubációt követően, Operetta fluoreszcens mikroszkópos képalkotó technikával vizsgálva.

4.6. LNP-k felvétele hEC sejtekbe: szubkonfluens és konfluens tenyészetek összehasonlítása

Az hEC sejtekben a GFP fluoreszcencia intenzitását az adott LNP kezelési csoportok sejtmag számához normalizálva az alacsonyabb (50-400 ng/mL mRNS) koncentrációk is mutattak enyhe, de stabil GFP expressziót, kismértékű koncentráció függés mellett (16. A, B ábra). A leghatékonyabb transzlációt az 1600 ng/ml mRNS-t tartalmazó LNP kezelési csoportok esetében mértük mind a szubkonfluens mind pedig a konfluens tenyészetek esetében. A szubkonfluens és a konfluens hEC sejtenyészetek esetében is ezt a leghatékonyabb kezelési csoportot (1600 ng/mL) összehasonlítva a szubkonfluens tenyészeteknél 2,6-szor magasabb GFP fluoreszcencia intenzitást mértünk, mint a konfluens tenyészetek esetében.

A HeLa sejtekhez hasonlóan tehát az agyi endotélsejtek esetében is a szubkonfluens tenyészetek magasabb GFP fluoreszcencia intenzitást mutattak (16. A ábra), a konfluens tenyészetekkel összehasonlítva (16. B ábra), ami több LNP felvételre és/vagy hatékonyabb transzlációra utal.



16. ábra. Szubkonfluens (A) és konfluens (B) hEC sejtenyészetek GFP fluoreszcencia intenzitása a sejszámmra normalizálva 24 órás LNP inkubációt követően. Statisztikai elemzés: egyutas ANOVA, majd Bonferroni-posztteszt, *P <0,05, ***P <0,001 a tápfolyadékkal kezelt kontroll csoporthoz képest, n =4-8.

Mindkét vizsgált sejtípus esetében is azt az eredményt kaptuk tehát, hogy a szubkonfluens tenyészetek könnyebben transzfektálhatóak, mint a konfluens tenyészetek.

A HeLa és a hEC sejtenyészetek leghatékonyabb transzlációt mutató LNP kezelési csoportjainak (800 ng/ml és 1600 ng/ml mRNS) sejszámmra normalizált GFP intenzitási eredményeit összehasonlítva pedig megállapítottuk, hogy a szubkonfluens HeLa sejtek 14,9-szer magasabb GFP fluoreszcencia intenzitást mutattak, mint a szubkonfluens hEC sejtek, míg a konfluens tenyészetek esetében a tumoros eredetű HeLa sejteknél 6,6-szor magasabb fluoreszcencia intenzitást mértünk az agyi endotélsejtekhez képest 24 órás LNP kezelést követően.

5. MEGBESZÉLÉS

5.1. Az LNP-k toxicitása

Az általunk elkészített, kisméterű és enyhén pozitív töltésű mRNS tartalmú lipid nanopratikumok stabil tárolásához szükséges volt 20% szukróz oldatot adni, ezért kísérleteink első lépéseként fontosnak tartottuk a nanorészecskék mellett a magas szukróztartalom esetleges sejtkárosító hatását is tesztelni. A valós időben jelölőmentes módon végzett impedanciaváltozáson alapuló sejtanálízis során megállapítottuk, hogy az alkalmazott LNP-k és szukróz koncentrációk egyike sem mutattak csökkenést az agyi endotélsejtek életképességében 24 órás kezelést követően. Ezek alapján elmondható, hogy ezek az anyagok magas kezelési koncentrációk esetében is megfelelően biztonságosak további transzfekciós kísérletekhez. Hasonlóan biztató eredményeket írtak le lipid nanorészecskékkel való kezelés hatására a szakirodalomban (Zak és mtsai. 2021, Ogawa és mtsai. 2022, M. Pardridge 2023), továbbá az LNP-k a Pfizer-BioNTech és a Moderna mRNS alapú vakcinaiban is megtalálhatók, nem toxikusak és alkalmasak az mRNS biztonságos célba juttatására azáltal, hogy megvédik azt a lebomlástól és lehetővé teszik, hogy bejusson a sejtekbe, ahol megkezdődhet a génexpresszió (Pardi és mtsai., 2015).

5.2. HeLa sejtek transzfektálása LNP-vel

Annak érdekében, hogy teszteljük és összehasonlíthassuk az LNP-k hatékonyságát, először egy már a szakirodalomban is leírt és jól ismert, könnyen transzfektálható cervikális karcinóma eredetű sejtvonalat vizsgáltunk. A HeLa sejtek transzfektálása során a sejtek először felvették a GFP mRNS-t tartalmazó LNP-ket, majd a transzfekció sikerességét a sejtekben transzlálódott GFP fehérje fluoreszcenciájának intenzitásával követtük. A legmagasabb intenzitást a 800 ng/ml mRNS koncentrációnál figyeltük meg. A koncentráció további növelésével (1600 ng/ml) a fluoreszcencia intenzitás csökkent, ami sejtkárosodásra is utalhat. A HeLa sejtek transzfektálása során a GFP mRNS-t tartalmazó lipid nanorészecskékkel végzett kísérletek magas szintű fehérje expressziót eredményeztek főként a szubkonfluens sejtenyészetekben, ahol szignifikánsabban jobb volt a transzláció mértéke, mint a konfluens tenyészetekben. Jelen kísérleteink is alátámasztják a szakirodalomi adatokat, mely szerint a magas mitotikus aktivitást mutató, szubkonfluens, tumoros eredetű HeLa sejtek érzékenyek az LNP-alapú transzfekcióra, könnyen transzfektálhatóak (M. Pardridge 2023, L. Han és mtsai.

2024), valamint a transzfekciós hatékonyság függ az alkalmazott mRNS koncentrációtól és az LNP-k összetételétől is (Khare és mtsai. 2023).

5.3. Humán agyi endotélsejtek transzfektálása LNP-vel

A vér-agy gátat alkotó agyi endotélsejtek számos speciális tulajdonságuknak köszönhetően szoros sejtréteget képeznek, ezáltal megnehezítik a gyógyszerek és biofarmakonok bejutását a vérkeringésből az agyszövetbe. A vér-agy gát érése során a sejtek mitotikus állapota alacsony (Porkoláb és mtsai., 2024), ami a transzfekció hatékonyságát is csökkenti. Célunk az volt, hogy megvizsgáljuk az mRNS tartalmú LNP-k sejtfelvételét nem konfluens és teljesen konfluens rétegű sejtenyészetekben is, követve a transzfekciós hatékonyságot. A humán agyi endotélsejtek LNP felvétele hasonló mintázatot mutatott, mint a HeLa sejtek esetében. A koncentráció függvényében a GFP fluoreszcens intenzitás növekedett, de az intenzitás mértéke szignifikánsan alacsonyabb volt HeLa sejtekben méretéhez képest. Ez a különbség arra utalhat, hogy az agyi endotélsejtek gátképző tulajdonságaiknak köszönhetően kevésbé hajlamosak az LNP-k felvételére, vagy eltérő transzlációs hatékonysággal rendelkeznek. A szubkonfluens tenyészetekhez képest az agyi endotélsejtek konfluens, érett gátrendszer létrehozó tenészete még alacsonyabb transzlációs hatékonyságot mutatott. A kísérlet eredményei alátámasztják a szakirodalomban leírtakat, hogy az endotélsejtek kis hatékonysággal transzfektálhatóak (Burkhart és mtsai. 2017, Sakurai és mtsai. 2022, Ogawa és mtsai. 2022, Khare és mtsai. 2023, Han és mtsai., 2024). Burkhart és munkatársai (2017) három különböző transzfekciós reagenst (Lipofectamine 3000TM, PEI, TurbofectTM) vizsgált meg, hogy összehasonlítsák azok hatékonyságát és citotoxicitását az agyi kapilláris endotélsejtek transzfekciójában. Céljuk az volt, hogy megtalálják a legmegfelelőbb reagenst, amely a vér-agy gát károsodása nélkül magas transzfekciós hatékonysággal juttatja be a neuroprotektív eritropoetint (EPO) az agyi endotélsejtekbe. Azt találták, hogy a transzfektálást követően mind a vér, mind pedig az agyi oldalon lévő endotélsejtek képesek voltak a rekombináns EPO-t szintetizálni. A leghatékonyabbnak a kationos lipid alapú Lipofectamine 3000TM reagens bizonyult, amivel még így is a kezelt endotélsejtek csak 8%-a vette fel a genetikai anyagot és volt transzfektálható.

A humán agyi endotélsejtek transzfekciós hatékonysága az érett gáttulajdonságokat mutató, szorosan kapcsolódó agyi endotélsejtek rétege felé haladva a konfluencia növekedésével alacsonyabb volt, amelyet számos szakirodalmi adat is alátámaszt. Hede és munkatársai (2020) tanulmányának célja azt volt, hogy az endotélsejtek Niemann-Pick C2

(NPC2) fehérjét termeljenek és szintetizáljanak, mely egy potenciális génterápiás lehetőség lehet a C típusú Niemann-Pick lizoszómális tárolási betegség kezelésére. Eredményeik azt mutatják, hogy nem konfluens monokultúrában 21%-os hatékonysággal, míg asztrocitákkal kiegészítve konfluens ko-kultúrában már csak 7%-os hatékonysággal működött a transzfektálás, míg a tumoros HeLa sejtekben ez az arány 75% volt (Hede és mtsai., 2020).

Mindezen irodalmi és jelen kísérleti eredményeink is alátámasztja annak szükségességét, hogy specifikus és jóval hatékonyabb transzfekciós protokollok fejlesztésére van szükség agyi endotélsejtek számára.

5.6. További terveink az agyi endotélsejtek transzfektálására

Jövőbeli célkitűzéseink között szerepel a GFP mRNS töltet helyett terápiás fehérje mRNS-ének LNP-be csomagolása. A szoros sejtkapcsolatok kialakításában központi szerepet játszó klaudin-5 fehérje expressziójának csökkenését, ezzel a vér-agy gát sérülését számos központi idegrendszeri betegségben, például sztrókban is kimutatták (Abdullahi és mtsai., 2018). A klaudin-5 mRNS-ének LNP-be történő csomagolásával, a fehérje sejten belüli expressziójának emelésével az endotélsejtek közötti kapcsolatok szorosabbá válhatnak, ami javíthatja a vér-agy gát funkcióit, és csökkentheti az agyi károsodás mértékét, melyet iszkémiás sztrók sejtenyészetes és *in vivo* modelljében is tesztelni szeretnénk.

6. ÖSSZEFOGLALÁS

Az agyba történő gyógyszerbejutás és az endotélsejtek génterápia céljából történő hatékony transzfektálása még megoldandó feladat. Ennek oka a speciális struktúrájú és működésű vér-agy gát, mely gátfunkciója révén megakadályozza a gyógyszerhatóanyagok felvételét a vérkeringésből az agyba. Erre a problémára megoldást jelenthetnek a nanorészecskék, melyek alkalmasak lehetnek arra, hogy segítségével a központi idegrendszeri megbetegedések kezelésére irányuló hatóanyagokat vagy genetikai anyagokat át tudjuk juttatni az agyi kapillárisok falán, a vér-agy gáton át az agyszövetbe.

A lipid nanopartikulumok a nem-virális génterápia ígéretes eszközei, mivel hatékonyan képesek különböző terápiás mRNS-eket biztonságosan szállítani biológiai membránokon keresztül, miközben alacsony immunválaszt váltanak ki ezáltal csökkentik a sejtkárosító hatások kockázatát.

A kísérleteinkben GFP mRNS-ét kódoló szolid lipid nanorészecskéket (LNP) vizsgáltunk HeLa és agyi endotélsejtek transzfektálása céljából. Eredményeink azt mutatják, hogy

- a vizsgált koncentrációtartományban az LNP-k nem gyakorolnak toxikus hatást az endotélsejtekre és biztonságosan alkalmazhatóak;
- a GFP fluoreszcencia intenzitása, ezáltal a transzláció mértéke koncentráció függően növekedett, és mindkét sejttípus esetében a szubkonfluens tenyészetekben magasabb volt, mint konfluens sejtrétegekben;
- hEC sejtekben szignifikánsan alacsonyabb volt a transzfekció mértéke, mint a HeLa sejtekben, mind szubkonfluens mind pedig konfluens tenyésztési körülmények esetében, ami alacsonyabb LNP felvételre és/vagy kevésbé hatékony transzlációs képességre utal.
- további kísérletekre van szükség a transzfektálási hatékonyság növelésére, valamint terápiás fehérjék mRNS-ének tesztelésére is.

7. IRODALOMJEGYZÉK

- Abbott NJ, Patabendige AA, Dolman DE, Yusof SR, Begley DJ. Structure and function of the blood-brain barrier. *Neurobiol Dis.* 2010 Jan;37(1):13-25.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006 Jan;7(1):41-53.
- Abdullahi W, Tripathi D, Ronaldson PT. Blood-brain barrier dysfunction in ischemic stroke: targeting tight junctions and transporters for vascular protection. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2018 Sep 1;315(3):C343-C356. doi: 10.1152/ajpcell.00095.2018
- Andjelkovic, A. V., Stamatovic, S. M., Phillips, C. M., Martinez-Revollar, G., & Keep, R. F. (2020). Modeling blood–brain barrier pathology in cerebrovascular disease in vitro: current and future paradigms. *Fluids and Barriers of the CNS*, 17(1), 44.
- Burkhart, A., Andresen, T. L., Aigner, A., Thomsen, L. B., & Moos, T. (2017). Transfection of primary brain capillary endothelial cells for protein synthesis and secretion of recombinant erythropoietin: a strategy to enable protein delivery to the brain. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 74(14), 2467–2485.
- Campbell M, Hanrahan F, Gobbo OL, et al. Targeted suppression of claudin-5 decreases cerebral oedema and improves cognitive outcome following traumatic brain injury. *Nat Commun.* 2012;3:849. doi:10.1038/ncomms1852
- Campos-Bedolla, P., Walter, F.R., Veszeka, S., Deli, M.A., 2014. Role of the blood-brain barrier in the nutrition of the central nervous system. *Arch. Med. Res.* 45, 610-638.
- Cecchelli, R., Aday, S., Sevin, E., Almeida, C., Culot, M., Dehouck, L., Coisne, C., Engelhardt, B., Dehouck, M. P., & Ferreira, L. (2014). A stable and reproducible human blood-brain barrier model derived from hematopoietic stem cells. *PloS one*, 9(6), e99733.
- Daneman, R., & Prat, A. (2015). The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 7(1), a020412.
- Dilliard SA, Sun Y, Brown MO, et al. The interplay of quaternary ammonium lipid structure and protein corona on lung-specific mRNA delivery by selective organ targeting (SORT) nanoparticles. *J Control Release.* 2023;361:361-372. doi:10.1016/j.jconrel.2023.07.058
- Han EL, Padilla MS, Palanki R, et al. Predictive high-throughput platform for dual screening of mRNA lipid nanoparticle blood-brain barrier transfection and crossing. *Nano Lett.* 2024;24(1):1477-1486. doi:10.1021/acs.nanolett.3c03509
- Hede E, Christiansen CB, Heegaard CW, Moos T. Gene therapy to the blood–brain barrier with resulting protein secretion as a strategy for treatment of Niemann Picks type C2 disease. *J Neurochem.* 2019;156:290-308. doi:10.1111/jnc.14982
- Hervé, F., Ghinea, N., Scherrmann, J.M., 2008. CNS delivery via adsorptive transcytosis. *AAPS J.* 10, 455-472.
- Johansson, B.B. (2001). Blood-Brain Barrier: Role of Brain Endothelial Surface Charge and Glycocalyx. In: Fukuuchi, Y., Tomita, M., Koto, A. (eds) *Ischemic Blood Flow in the Brain*. Keio University Symposia for Life Science and Medicine, vol 6. Springer, Tokyo.
- Karikó K. Modified uridines are the key to a successful message. *Nat Rev Immunol.* 2021

- Khare P, Edgecomb SX, Hamadani CM, et al. Lipid nanoparticle-mediated drug delivery to the brain. *Adv Drug Deliv Rev.* 2023;197:114861. doi:10.1016/j.addr.2023.114861
- Male D, Gromnicova R. Nanocarriers for delivery of oligonucleotides to the CNS. *Int J Mol Sci.* 2022;23:760. doi:10.3390/ijms23020760
- Marcos-Contreras OA, Greineder CF, Kiseleva RY, et al. Selective targeting of nanomedicine to inflamed cerebral vasculature to enhance the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020;117(7):3405-3414. doi:10.1073/pnas.1912012117
- Ogawa K, Kato N, Yoshida M, et al. Focused ultrasound/microbubbles-assisted BBB opening enhances LNP-mediated mRNA delivery to brain. *J Control Release.* 2022;348:34-41. doi:10.1016/j.jconrel.2022.05.042
- Pardi, N., Tuyishime, S., Muramatsu, H., Kariko, K., Mui, B. L., Tam, Y. K., Madden, T. D., Hope, M. J., & Weissman, D. (2015). Expression kinetics of nucleoside-modified mRNA delivered in lipid nanoparticles to mice by various routes. *Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society*, 217, 345–351. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2015.08.007>
- Pardridge WM. Brain gene therapy with Trojan horse lipid nanoparticles. *Trends Mol Med.* 2023;29(5):343-355. doi:10.1016/j.molmed.2023.02.004
- Porkoláb, G., Mészáros, M., Szecskó, A., Vigh, J. P., Walter, F. R., Figueiredo, R., Kálomista, I., Hoyk, Z., Vizsnyiczai, G., Gróf, I., Jan, J. S., Gosselet, F., Purity, M. K., Vastag, M., Hudson, N., Campbell, M., Veszeka, S., & Deli, M. A. (2024). Synergistic induction of blood-brain barrier properties. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(21), e2316006121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2316006121>
- Ribeiro, M.M., Domingues, M.M., Freire, J.M., Santos, N.C., Castanho, M.A., 2012. Translocating the blood-brain barrier using electrostatics. *Front. Cell. Neurosci.* 11, 6-44.
- Sakurai Y, Watanabe H, Nishio K, et al. pH-Responsive Lipid Nanoparticles Achieve Efficient mRNA Transfection in Brain Capillary Endothelial Cells. *Pharmaceutics.* 2022;14:1560. doi:10.3390/pharmaceutics14081560
- Samaridou, E., & Munteanu, C. R., & Tagalakis, A. D., & Al-Jamal, K. T. (2020). Lipid nanoparticles for nucleic acid delivery: Challenges and opportunities. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 154-155, 37–62.
- Santa-Maria, A. R., Walter, F. R., Figueiredo, R., Kincses, A., Vigh, J. P., Heymans, M., Culot, M., Winter, P., Gosselet, F., Dér, A., & Deli, M. A. (2021). Flow induces barrier and glycocalyx-related genes and negative surface charge in a lab-on-a-chip human blood-brain barrier model. *Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 41(9), 2201–2215.
- Solly, K., Wang, X., Xu, X., Strulovici, B., & Zheng, W. (2004). Application of Real-Time Cell Electronic Sensing (RT-CES) Technology to Cell-Based Assays. *Assay and Drug Development Technologies*, 2(4), 363–372.
- Tosi G, Musumeci T, Ruozi B, et al. The “fate” of polymeric and lipid nanoparticles for brain delivery and targeting: Strategies and mechanisms of blood-brain barrier crossing and

- trafficking into the central nervous system. *J Drug Deliv Sci Technol.* 2016;32:66-76. doi:10.1016/j.jddst.2015.07.007
- Žak MM, Zangi L. Lipid nanoparticles for organ-specific mRNA therapeutic delivery. *Pharmaceutics.* 2021;13(10):1675. doi:10.3390/pharmaceutics13101675
- Zhang X, Jin H, Huang X, et al. Robust genome editing in adult vascular endothelium by nanoparticle delivery of CRISPR-Cas9 plasmid DNA. *Cell Rep.* 2021;38:110196. doi:10.1016/j.celrep.2021.110196
11. ábra: <https://per-form.hu/perkinelmer/high-content-screening/perkinelmer-operetta-high-content-imaging-system/>

8. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Veszélka Szilviának, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet Biológiai Barrierék Kutatócsoport tudományos főmunkatársának a munkám során nyújtott szakmai támogatását, hasznos tanácsait és bátorítását.

Köszönöm Szecskó Anikónak, a Biológiai Barrierék Kutatócsoport PhD hallgatójának labormunkám során nyújtott segítségét, türelmét és hasznos tanácsait, motiváló szavait.

Köszönöm a Biológiai Barrierék kutatócsoport minden jelenlegi és volt tagjának kedvességét és biztatását, kiemelve Dr. Mészáros Máriát és Dr. Barna Lillát, akik megtanítottak az önálló munkavégzésre a steril sejtenyésztés alapjaira a laborban.

Köszönöm Prof. Deli Máriának, a Szegedi Biológiai Kutatóközpont Biofizikai Intézet vezetőjének és a Biológiai Barrierék Kutatócsoport kutatóprofesszorának, hogy lehetőséget adott a tudományos labormunka elsajátítására a csoport tagjaként.

Végezetül szeretnék köszönetet mondani Dr. Csontné Dr. Kiricsi Mónikának a Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai karának, a Biokémia és Molekuláris Biológia Tanszék habilitált egyetemi docensének és oktatási intézetvezető-helyettesének, belső konzulensi segítségét és támogatását.

TÉTELES SZAKMAI HOZZÁJÁRULÁS

Alulírott **Cser Nárcisz Mónika** nyilatkozom, hogy a 2024. évi őszi helyi TDK-ra benyújtott *mRNS töltetű szolid lipid nanorészecskék vizsgálata humán sejtenyészeteken* című pályamunkámban leírtak esetében az alábbi munkafolyamatok elvégzésében vettem részt:

Részfeladat	A részvétel mértéke (ötfokozatú skálán jellemezve)
Sejtenyészetek létrehozása	4
Valós idejű sejtanálízis	5
Sejtfelvételi kísérletek elvégzése	4
Az adatok statisztikai feldolgozása	4
Ábrák elkészítése	5

Kelt: Szeged, 2024.11.11



Pályamunkát benyújtó hallgató
aláírása

A nyilatkozatban foglaltak helyességét megerősítem:



Témavezető aláírása