

Egér különböző szöveteiből, szerveiből izolált mesenchymalis őssejtek összehasonlító vizsgálata

Doktori értekezés

Sági Bernadett

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Habil Uher Ferenc kutatóprofesszor, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Kovalszky Ilona egyetemi tanár, D.Sc.
Dr. Lippai Mónika, egyetemi adjunktus Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Demeter Judit egyetemi tanár, D.Sc.
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Minkó Krisztina egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Molnár Kinga egyetemi adjunktus, Ph.D.

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	
1.1. Az embrionális és a szöveti őssejtek. A mesenchymalis ős-, vagy stroma sejtek elhelyezése a szöveti őssejtek között	7
1.2. A mesenchymalis ős- vagy stroma sejtek részletes bemutatása	8
Az MSC-k definiálása	8
Az MSC-k differenciációs és osztódási potenciálja	9
Az MSC-k szöveti forrásai, in situ helyük, szerepük kérdései	11
Az MSC-k szövetregenerációban betöltött szerepe	13
Az MSC-k immunmoduláló képességgel rendelkeznek	15
1.3. A mesenchymalis stroma sejtek feltételezett fejlődéstani eredete	18
Az MSC-k kialakulására vonatkozó elképzelések	18
Az MSC-k kialakulásának idején zajló embriológiai események áttekintése	21
A mesoderma kialakulása	21
A paraxiális mesoderma feldarabolódása: a somitogenezis	24
A pozicionális információ és a Hox gének kialakulása	25
A Hox gének jellemzése és funkciója	26
2. Célkitűzések	30
3. Anyagok és módszerek	32
3.1. A mesenchymális őssejtek izolálása és tenyésztése	32
3.2. Polimeráz láncreakción (PCR) alapuló vizsgálatok	34
PCR Array módszer géncsoportok átíródásának egyidejű vizsgálatára	34
Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) egyes gének átíródásának vizsgálatára	35

3.3. Az adatok elemzése	35
3.4. A PCR eredmények validálása a fehérje kifejeződés szintjén	36
Áramlási citometria	36
Immunfluoreszcencia	36
Western blot	37
Citokin fehérjék kimutatása felülúszóból	37
3.5. A mesenchymalis őssejtek plaszticitásának vizsgálata	38
Csont irányú differenciáltatás	38
Zsírsejt irányú differenciáltatás	38
3.6. Az aorta fali MSC-k vérképzés-támogató képességének vizsgálata	38
Dexter típusú kokultúra	39
Osteoclast irányba történő differenciáltatás	39
A vérképző rendszer in vivo betelepülésének vizsgálata	39
4. Eredmények	40
4.1. Mesenchymalis stroma sejtek izolálása egér különböző szövetekből, szerveiből	40
4.2. Sejtfelszíni markerek vizsgálata	40
4.3. A sejtek plaszticitásának vizsgálata	44
4.4. A különböző szöveti eredetű MSC-k génkifejeződési mintázatainak összehasonlítása citokinekre, növekedési faktorokra, csont morfogénikus fehérjékre és sejtadhéziós molekulákra nézve	48
4.5. Az MSC-k nem fejeznek ki pluripotencia géneket	54
4.6. Az aortából kivont stroma sejtek némileg „kilógnak” a sorból – a különbözőség részletesebb vizsgálata	56
Dexter-típusú kokultúra teszt	59
Osteoclast irányú differenciálódás	60
In vivo transzplantáció	61
4.7. A mesodermális eredetre utaló gének kifejeződése az MSC-kben	62
4.8. Az MSC-k pozicionális memóriája	65

5. Megbeszélés	75
5.1. A különböző szöveti eredetű adherens sejtek karakterizálása	75
5.2. A különböző szöveti eredetű adherens sejtek génkifejeződési jellegzetességeik összehasonlítása	75
5.3. A különböző szöveti eredetű adherens sejtek leszármazása: az egyedfejlődés történései és az izolálás forrásául szolgáló szöveti környezet pozicionális memóriája a génkifejeződés jellegzetességeiben	77
6. Következtetések	86
7. Összefoglalás	88
Összefoglalás	88
Summary	89
8. Irodalomjegyzék	90
9. Publikációk jegyzéke	107
10. Köszönetnyilvánítás	109
11. Kiegészítő táblázatok	110
1. Kiegészítő táblázat	110
2. Kiegészítő táblázat	116
3. Kiegészítő táblázat	122

Rövidítések jegyzéke

Rövidítés		angol		magyar
ADRC		Adipose tissue-derived regenerative cells		Zsírszöveti regeneratív sejtek
AGM		Aorta-gonad-mesonephros		Aorta-gonad-mesonephros
BM-MSC		Bone marrow MSC		Csontvelői MSC
cDNS		Cyclic DNA		Ciklikus DNS
CFU-F		Colony-forming unit fibroblast		Fibroblast kolónia képző sejtek
CM	-	Complete medium	-	Komplett tenyésztőfolyadék
Csv-MSC	-	-	-	Felnőtt (10-12 hetes) egér csontvelőjéből izolált MSC
DC		Dendritic cell		Dendritikus sejt
DMEM	-	Dulbecco's modified Eagle's medium	-	Dulbecco által módosított Eagle-féle tápoldat
DTT		dithiothreitol	-	ditiotreitól
EDTA	-	ethylenediaminetetraacetate	-	etilén-diamin-tetra-acetát
EMT	-	Epithelial to mesenchymal transition	-	epitélialis-mesenchymalis átalakulás
FCS	-	Foetal calf serum	-	Magzati borjúsavó
GFP	-	Green fluorescent protein	-	Zöld fluoreszcens fehérje
GVHD	-	Graft versus host disease	-	Graft versus host betegség
Hox	-	Homeobox	-	Homeobox
HSC	-	Haematopoietic stem cells	-	Vérképző őssejtek
IBMX		3-izobutil-1-metilxantin	-	Izobutil-metilxantin
ICM		Inner cell mass	-	Belső sejtmassza
ISCT	-	International Society for Cellular Therapy	-	-
JAo-MCS	-	-	-	Juvenilis (14 napos) egér

				aorta falából izolált MSC
JC _{sv} -MSC	-	-	-	Juvenilis (14 napos) egér csontveléből izolált MSC
JL _p -MSC	-	-	-	Juvenilis (14 napos) egér lépéből izolált MSC
JThy-MSC	-	-	-	Juvenilis (14 napos) egér thymusából izolált MSC
MET	-	Mesenchymal to epithelial transition	-	Mesenchymalis-epithelialis átalakulás
mRNS		Messenger RNA		Hírvivő RNS
MSC	-	Mesenchymal stem/ stromal cell	-	Mesenchymális ős-, vagy stroma sejt
NK sejt	-	Natural killer sejt	-	Természetes ölüsejt
PBS	-	Phosphate-buffered saline	-	Foszfáttal pufferált sóoldat
PCNA	-	Proliferating cell nuclear antigen	-	Osztódó sejtek magi antigénje
PCR	-	Polimerase chain reaction	-	Polimeráz lánreakció
PE	-	phycoerythrin	-	fikoeritrin
PMSF	-	Phenylmethanesulfonylfluorid	-	Fenil-metán-szulfonil-fluorid
RNS	-	Ribonucleic acid	-	Ribonukleinsav
SVF	-	Stromal-vascular fraction	-	Stromális-vaszkuláris frakció
UCB-MSC	-	Umbilical cord blood MSC	-	Köldökzsinórvér MSC

1. Bevezetés

1.1. AZ EMBRIONÁLIS ÉS A SZÖVETI ÖSSEJTEK. A MESENCHYMALIS ÖS-, VAGY STROMA SEJTEK (MSC-K) ELHELYEZÉSE A SZÖVETI ÖSSEJTEK KÖZÖTT

Az őssejtbiológia az elmúlt években a modern kori orvosi kutatások egyik legforrongóbb területévé nőtte ki magát. Ennek oka, hogy az őssejtek olyan klonogén sejtek, melyek önfenntartásra és egyidejűleg olyan sejtfejlődési sorok elindítására képesek, melyek más, differenciált sejttypusokat alakítanak ki, ezáltal regenerációra, elpusztult sejtek pótlására is alkalmasak lehetnek.

Eleinte a kutatások a korai embrionális korból származó embrionális őssejtekben rejlő lehetőségekre koncentráltak. Az első humán embrionális őssejtvonalat Thomson és mtsai izolálták 1998-ban a blastocysta stádiumú embrió belső sejtcsoportjából (Thomson és mtsai 1998). Az ES sejtek vizsgálatával és felhasználásával kapcsolatban azonban súlyos etikai aggályok merülnek fel, továbbá problémát okoz az embrionális sejtek nagy tumorigenitása, valamint a szöveti összeférhetetlenség kérdése. Kutatásuk jelenleg elsősorban az *in vitro* gyógyszer kipróbálásához kapcsolódó szövetek előállításának irányában folyik.

Az etikai és technikai nehézségek miatt a későbbiekben egyre inkább a szöveti őssejtek kerültek a regeneratív orvoslással foglalkozó kutatók figyelmének középpontjába. Az utóbbiak közé tartozó vérképző őssejtekről (HSC-kről) már az 1960-as években kiderült, hogy sikeresen alkalmazhatók egyes vérképző- és nyirokszervrendszeri betegségek kezelésében (Thomas és mtsai 1975). A mára már rutinszerűen kinyerhető és beültethető HSC-k forrása a csontvelő és újabban a köldökzsinórvér. Ugyanakkor az évek során nyilvánvalóvá vált, hogy csaknem minden szervünkben, szövetünkben találhatóak olyan, differenciációs potenciállal bíró sejtek, melyek az adott szövet szöveti őssejtjeinek, a szövetet alkotó végdifferenciált sejtek progenitorainak tekinthetőek. Például bőr, bélhám, hajhagyma, izom eredetű őssejteket izoláltak világszerte az ezzel foglalkozó laboratóriumok (Mackenzie és mtsai 1970, Cheng és mtsai 1974, Mauro és mtsai 1961). Még a központi idegrendszerben is

őssejtekre bukkantak (neuronális őssejtek, NSC-k) (Reynolds és mtsa 1992), pedig az idegszövetet korábban állandósult szövetnek tartották, melyben felnőtt korban új sejtek már nem keletkeznek. Ezek mellett, úgy tűnik, hogy valamennyi szervünkben megtalálható, feltehetően a mindenütt fellelhető stromában egy, terápiás szempontból is különlegesen érdekes tulajdonságokkal bíró őssejt-típus. Ezek a mesenchymális ő-, vagy stroma sejtek (MSC-k), melyek a mi vizsgálódásaink tárgyát is képezik. Az MSC-k nemcsak hogy több szöveti forrásból is könnyen izolálhatóak, de jól tenyésztethetők, *in vitro* jól növekvő sejtek. A tenyészetben is potensek, plasztikusak, vagyis a tenyésztési körülmények megváltoztatásával több irányba differenciáltathatóak. Eredeti *in vivo/in situ* funkciójuk még tisztázásra szorul, de számos bizonyíték szól amellett, hogy terápiásan visszaadva az *in vitro* felszaporított sejteket, regeneratív és immunmoduláló képességekkel bírnak.

A következő fejezetben részletesebben kifejtyük az MSC-k azon tulajdonságait, melyek kiemelten ígéretes célpontjává teszik a preklinikai és klinikai kutatásoknak ezeket a sejteket.

1.2. A MESENCHYMALIS ŐS-, VAGY STROMA SEJTEK RÉSZLETES BEMUTATÁSA

Az MSC-k definiálása

Az MSC-k olyan, nem vérképző ő- és elődsejtek, amelyeket először a csontvelőből nyertek ki (Friedenstein és mtsai 1976). Eredetileg úgy írták le őket, mint - *in vitro* körülmények között - fibroblast-szerű morfológiával rendelkező, kolóniaképző sejteket, ezért CFU-F sejteknek (=colony-forming unit fibroblast) nevezték el őket. A kísérletekben egér hátbőre alá beoltva, ott ektopikusan (a normál előfordulási helytől eltérő módon) csontot képeztek, melyben a vérképzést támogató mikrokörnyezet jött létre. Ennek alapján tételezték fel azt, hogy szerepük eredendően a csontvelőben is a vérképző rendszer működését segítő stroma állomány létrehozása (Friedenstein és mtsai 1987). Később hasonló tulajdonságú sejteket több szöveti forrásból is sikerült kinyerni (ld. (3). pont alatt).

Az MSC-k izolálása műanyag felületekhez történő kitapadási hajlamuk – plasztik adherenciájuk – révén, a legtöbb őssejtípussal ellentétben viszonylag könnyen kivitelezhető a csontvelőből, vagy kellően homogenizált és megemésztett más szövetekből. Ugyanakkor nincs egyetlen olyan marker molekula sem, amely segítségével kizárólagosan megkülönböztethetők lennének más sejtektől. Az izolált és kultúrában tartott MSC-k sejtfelszínén nagyszámú fehérje azonosítható ugyan, de ezek mindegyike számos más sejttípuson is megtalálható. Annak eldöntésére, hogy a különböző anatómiai helyekről, a különböző munkacsoportok által, részben eltérő módszerekkel izolált MSC-knek tartott sejtek valóban ugyanazon sejttípus képviselői-e, 2006-ban az ISCT (International Society for Cellular Therapy) nevű nemzetközi szervezet szükségesnek ítélte, hogy kidolgozzon egy kritériumrendszert. Az emberi MSC-kre vonatkozó megállapodás (Dominici és mtsai 2006) értelmében azokat a sejteket nevezhetjük mesenchymalis ő-, vagy helyesebben stroma sejteknek, amelyek egyidejűleg megfelelnek az alábbi kritériumoknak:

1. Adherensek, azaz a tenyésztőedény falához kitapadva növekednek;
2. CD105, CD73 és CD90 pozitívok, de nem hordoznak vérképző ő- és elődsejtekre, illetve a különböző vérsejtfejlődési sorokra jellemző markereket, vagyis CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79, CD19 molekulákat és HLA-DR negatívok;
3. *in vitro* csont-, porc- és zsírsejteké egyaránt képesek differenciálódni.

Megjegyzendő, hogy a sejtfelszíni markerek szempontjából némi különbség mutatkozik az egér eredetű MSC-k esetén, amelyek egységesen kifejeznek Sca-1-et és CD44-et, de a CD73, CD90 és CD105 pozitívítás változó lehet (da Silva Meirelles L és mtsai 2003; Tropel és mtsai 2004; Guo és mtsai 2006).

Az MSC-k differenciációs és osztódási potenciálja

Az MSC-k differenciációs potenciáljuk szempontjából multipotensnek tekinthetők, mivel számos mesodermális eredetű sejttípust (osteoblast, chondrocyta, adipocyta, fibroblast, myofibroblast és simaizom sejt) képesek létrehozni (Pittenger és

mtsai 1999). Az ilyen irányú differenciációs képességet ortodox plaszticitásnak nevezzük, hiszen nem lépi át a csíralamezek jelentette határokat. Megjegyzendő azonban, hogy több kutatócsoport eredményei is arra engednek következtetni, hogy az MSC-kból előhívható a csíralamezeket átlépő, szélesebb spektrumú differenciálódási képesség is, ún. nem ortodox plaszticitás. Az MSC-k megfelelő induktorok hatására akár még ectodermális (neuron, glia) (Sanchez-Ramos és mtsai 2000) és endodermális (β -sejt, hepatocytá) sejttípusokat is ki tudnak alakítani, legalábbis *in vitro* (Weng és mtsai 2003).

A teljes igazsághoz hozzátartozik, hogy az MSC kultúrák heterogén összetételűek, vagyis nem kizárólag mesenchymalis őssejtekből állnak, hanem az azokból képződött tri-, bi- és unipotens elődsejtekből is. Ennek oka, hogy a tenyésztés során a sejtosztódásokkal egyidejűleg spontán differenciáció is történik a kultúrákban. Emiatt helyesebb mesenchymalis őssejtek helyett inkább mesenchymalis stroma sejteknek nevezni az *in vitro* tenyészeteket, fenntartva, hogy a valódi őssejt tulajdonságokkal bíró sejtek is jelen vannak a tenyészetben. A sejtek nevezéktana ezen ok miatt (is) volt zavartkeltő az elmúlt évtizedekben. Elnevezésük ugyanis egységesen „mesenchymalis őssejtek” volt, majd 2005-ben az ISCT bevezette a – sejt kultúrák plaszticitását pontosabban tükröző – „multipotens mesenchymalis stroma sejtek” elnevezést (Horwitz és mtsai 2005).

Az egérből izolált stromasejt kultúrák korlátlan ideig tenyészthetők. A tapasztalatok szerint (Javazon és mtsai, 2004) a sejtek 6-8 átoltás után spontán immortalizálódnak, 40-50. átoltás után pedig neoplasztikussá válnak, azaz immunkompetens állatokban is tumort képeznek (Sreejit és mtsai 2012).

A különböző emberi szövetekből izolált MSC-k *in vitro* kultúrában történő tenyésztéséről korábban azt feltételezték, hogy csak rövid ideig lehetséges, mivel az elsőként izolált csontvelő eredetű stroma sejtek (bone marrow MSC, BM-MS) már az 5-10. átoltás után elveszítik osztódó és differenciációs képességüket, előregednek, idegen szóval szeneszccenssé válnak. A tapasztalatok szerint viszont úgy tűnik, hogy az emberi zsírszövetből származó stroma sejtek (adipose tissue-derived regenerative cells, ADRC) ennél jóval tovább, akár két-háromszor annyi ideig fenntarthatóak. A sejtosztódások gyakoriságát és számát tekintve azonban a köldökzsinórvér eredetű MSC-knek (umbilical cord blood MSC, UCB-MS) van a legnagyobb proliferációs

képessége (Kern és mtsai 2006). Ugyanakkor – az egér MSC-ktől eltérően – az emberi stroma sejtek soha nem immortalizálódnak a tenyésztés során.

Az osztódási képesség attól is függhet, milyen korú donorból származnak a sejtek. Különösen a BM-MSK-kre igaz, hogy a kor előrehaladtával egyre kevesebb stroma sejt nyerhető ki a csontvelőből (Kern és mtsai 2006).

Nem csak nagymértékű osztódási, de jelentős differenciációs potenciáljuk, valamint szinte korlátlan hozzáférhetőségük (zsírleszíváskor keletkező és kidobásra szánt anyag) miatt, a zsírszövetben található MSC-k (ADRC) az első számú jelölteké válhatnak a sejteken alapuló terapiák, valamint új esztétikai célú beavatkozások kifejlesztésében (mellnagyobbítás, arc- és kézfiatalítás stb).

Az MSC-k szöveti forrásai, in situ helyük, szerepük kérdései

Az 1970-es évek óta – amikor Friedenstein és munkatársai először izoláltak csontvelőből MSC-t – kiderült, hogy az ott található stroma sejtekhez morfológiailag és funkcionálisan nagyon hasonló sejtek az ember számos más szövetéből és szervéből is sikeresen kinyerhetők. Különösen alkalmasak erre azok a szövetek, amelyek kiterjedt kötőszövetes vázzal és gazdag érhálózattal rendelkeznek. Gazdag MSC forrás például a zsírszövet (Gronthos és mtsai 2001, Zuk és mtsai 2002), a köldökzsinór (Romanov és mtsai 2003), a fogbél (Gronthos és mtsai 2011), a placenta (Fukuchi és mtsai 2004), a köldökzsinórvér (Rubinstein és mtsai 1993), az ízületi folyadék (De Badri és mtsai 2001), de még a fogíny is (Zhang és mtsai 2010).

A kísérleti és a későbbi terapiás célú izolálás szempontjából lényeges kérdés, hogy honnan lehet a legtöbb MSC-t kinyerni. A stroma sejtek előfordulási aránya a különböző szövetekben igen változó, és nagyban függ attól, milyen korú az adott szervezet. A fogbél és fogíny esetén szintén a rendelkezésre álló mennyiség a limitáló tényező. A köldökzsinór esetében a stroma sejtek gyűjtése csak egy szűk időintervallumban lehetséges, pontosabban a születést követő órákban. A tapasztalatok szerint a legnagyobb arányban a zsírszövet tartalmazza ezeket a sejteket. Míg az eredeti forrásként leírt csontvelőben az MSC-k száma az összes magvas sejtnek csupán mintegy 0,001-0,002%-a, addig a zsírszövetben ez az arány elérheti az 1-2%-ot (Puissant és

mtsai 2005, Fraser és mtsai 2006). A zsírszövetnek nagy előnye, hogy szinte korlátlan forrásként áll rendelkezésre, míg a csontvelő kinyerése igen fájdalmas, nem mentes minden kockázattól és csak kis mennyiségben lehetséges.

A különböző szövetekben, szervekben található MSC-k - a legtöbb kutató szerint - minden tulajdonságukban hasonlítanak a csontvelői stromát alkotó sejtekre. Valamennyi típus plasztik adherenciát mutat. Emellett multipotensek, vagyis képesek differenciálódni osteoblast, adipocyta és chondrocyta irányokba. Egységesen kifejeznek olyan sejtfelszíni antigéneket mint a CD73, CD90 és CD105, ugyanakkor CD34 és CD45 molekulákat nem hordoznak (Dominici és mtsai 2006).

A kutatások próbálnak magyarázatot találni arra a tényre, hogy az MSC-k miért található meg szinte az összes szövetünkben. A sejtek *in vivo* „kilétének” tisztázásában, az MSC-k *in situ* azonosításában nagy segítség lehet, hogy az évek során folyamatosan bővült az MSC-k azonosítására szolgáló marker molekulák köre. Crisan és munkacsoportja (Crisan és mtsai 2008) ilyen beazonosítás alapján feltételezi, hogy az MSC-k valójában az erek falában elhelyezkedő perivasculáris sejtekkel (kapillárisok esetében pericytákkal) azonosak. A kutatócsoport perivasculáris sejteket izolált különböző emberi szövetekből és szervekből (vázizom, hasnyálmirigy, zsírszövet, placenta) és vizsgálta azok sejtfelszíni markereit, differenciációs képességeit és migrációját. Az általuk izolált sejteken a klasszikus MSC markereken kívül sikerült kimutatni további, az MSC-kre is jellemző CD140b (PDGFR- β), CD146 (MCAM) és NG2 fehérjéket, valamint hiányoztak róluk a vérképző és endothel sejt markerek. A pericyták differenciációja – szintén az MSC-khez hasonló módon – osteoblast, adipocyta és chondrocyta irányokba sikeres volt. Elképzelésük – melyet azóta számos más munka is alátámaszt (da Silva Meirelles L és mtsai 2008) – magyarázatul szolgálna arra a megfigyelésre is, hogy az MSC-k miért található meg olyan nagy mennyiségben a zsírszövetben. Ugyanakkor hangsúlyozni kell, hogy a fenti bizonyítékok közvetettek. Az MSC-pericyta, illetve a perivasculáris régió - „MSC-niche” azonosságát csak akkor lehetne egyértelműen igazolni, ha találnánk egy olyan – „MSC specifikus” – gént, amelynek segítségével az ontogenezis során végig tudnánk követni ezeknek a sejteknek az eredetét és sorsát (lineage tracing). Ez azonban eddig egyetlen munkacsoportnak sem sikerült.

Az MSC-k szövetregenerációban betöltött szerepe

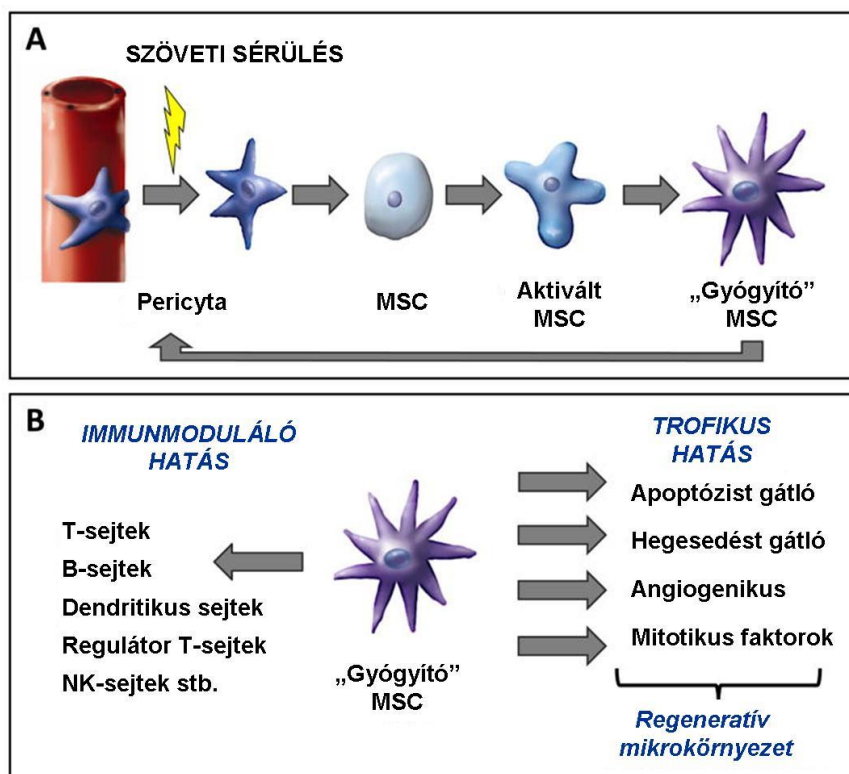
Baleset vagy betegség következtében kialakuló szöveti sérülés hatására beindul az adott szövet öngyógyító mechanizmusa, a szövetregeneráció. Ebben a folyamatban őssejtek is részt vesznek, de hogy pontosan hogyan, arra többféle elképzelés létezik. Egyrészt feltételezik, hogy az elhalt sejteket az őssejtek közvetlen módon pótolják – differenciációs potenciáljuk révén – differenciáció, dedifferenciációt követő differenciáció, vagy direkt transzdzifferenciáció révén (Herzog és mtsai 2003, Forbes és mtsai 2002, Rudnicki 2003). Ekkor jutna szerephez *in vivo* az MSC-kben *in vitro* megfigyelt ortodox és nem ortodox plaszticitás. A mesenchymalis stroma sejtek elsősorban csont-, porc-, zsír- és vérképzést támogató stroma sejteket létrehozni, vagyis az arra a csíralemezre jellemző sejteket, amelyből maguk is kialakultak. Ezt nevezzük ortodox plaszticitásnak. A nem ortodox plaszticitás ezzel szemben ellentmond azon korábbi ismeretünknek, amely szerint a sejt differenciálódás egy lineárisan előrehaladó, megfordíthatatlan folyamat, amelyben az eltérő csíralemezekből kialakuló sejtsorok között nincs lehetőség az átlépésre. Az elmúlt években számos beszámoló szólt arról, hogy az MSC-k mind *in vivo*, mind *in vitro* körülmények között képesek átalakulni glia- és idegsejtekké (Sanchez-Ramos 2002), izomrostokká (Bianco és mtsai 2001), szívizomsejtekké, epithel sejtekké (Herzog és mtsai 2003), vagy inzulintermelő β -sejtekké (Tang és mtsai 2004).

Mai felfogásunk szerint azonban valószínűbb, hogy az MSC-k nem új sejtek létrehozásával, hanem közvetett módon, az általuk termelt molekulákon keresztül segítik elő az adott szövet helyreállítását (trofikus és immunmoduláló hatás) (Urbán és mtsai 2011). Olyan autokrin, parakrin, esetleg juxtakrin faktorok ezek, amelyek megakadályozzák az immunrendszer túlműködését, csökkentik a gyulladást, a hegképződést, gátolják az apoptózist, és elősegítik az angiogenezist, valamint az endogén szöveti őssejtek osztódását (Caplan és mtsai 2011; Nauta és mtsai 2007). Emellett szól, hogy az MSC-k olyan szolúbilis faktorokat termelnek, melyek pozitívan hatnak az érzékelés folyamatára és a szövetek helyreállítására szívinfarktus vagy stroke után is (Caplan és mtsai 2006).

A szolúbilis faktorok által történő regeneráció serkentést úgy képzelhetjük el, hogy a szöveti károsodást érzékelő stroma sejtek olyan biológiailag aktív molekulákat

kezdenek termelni, melyek által egy olyan mikrokörnyezetet teremtenek a sérült szövetek körül, amelyben a regeneráció folyamata zavartalanul működhet. Sajnos éppen ez a nagyfokú támogató funkció figyelhető meg a tumorok körül kialakuló mikrokörnyezetben is. Kimutatták ugyanis, hogy a szervezetbe bejuttatott MSC-k maguk ugyan nem hoznak létre daganatokat, mégis hozzájárulhatnak azok növekedéséhez. A tumoros sejtek jelzéseit érzékelve, azok közelébe vándorolva képesek részt venni a tumor stromájának kialakításában. Ezáltal elősegíthetik a daganatsejtek osztódását és terjedését. Feltételezhető, hogy a tumort is szövetkárosodásként érzékelve regeneratív szerepüknek megfelelően, de az egész szervezet szempontjából nyilván hibásan táplálják a kóros sejteket, sőt még az immunrendszertől is védik őket, úgy, ahogy egy gyógyuló sebben is csökkentik a túlzott gyulladást (Zhu és mtsai 2006, Hall és mtsai 2007).

A fentiek miatt lényeges kérdés, hogy a terápiásan bejuttatni szándékozott MSC-k vajon hova jutnak a szervezeten belül, és ott képesek-e kifejteni a megfelelő regenerációt célzó hatást. Megfigyelték, hogy az *in vitro* felszaporított, majd a szervezetbe intravénásan bejuttatott MSC-k – a vérképző őssejtektől eltérően – nem a csontvelőbe vándorolnak (minden csontvelő-transzplantált beteg és kísérleti állat stromája a recipienstől származik), hanem szétszóródnak a különböző – elsősorban a gazdagon kapillarizált – szövetekben. A sejtek zöme a tüdőben és a vesékben telepszik meg (Gao és mtsai 2001, Anjos-Afonso és mtsai 2004). Ez egyrészt adódhat egyszerű elakadásból a szűk lumenű kapillárisokban, de az is állhat a háttérben, hogy az MSC-k oda igyekeznek, oda „homingolnak”, ahova az izolálásuk előtt tartoztak, vagyis az érfalba. Utóbbi esetben azoknak lenne igazuk, akik a pericytákkal azonosítják az MSC-ket (Covas és mtsai 2008). Az elméletük szerint szöveti sérülés esetén létrejövő kemotaktikus ingerek hatására a pericyták egy része kilép az érfalából és aktiválódva a károsodás helyére vándorol (1/A ábra). Ott aztán az általuk termelt szolúbilis faktorokkal segítik elő a szövet endogén regenerációját (Caplan és Dennis 2006) (1/B ábra). Noha ezek a molekulák akár távolról is hatékonyak lehetnek, közvetlenül a sérülés helyére adva az őssejteket általában jobban érvényesül a sejtek regenerációt elősegítő hatása (Chamberlain és mtsai 2007).



1. ábra: A pericyták feltételezett szerepe a szöveti regeneráció elősegítésében.

Az „A” ábrán az erek falában *in vivo* megtalálható pericyta szöveti sérülés hatására bekövetkező aktivációja követhető végig. Az érfalat érintő károsodás hatására az ott tartózkodó pericyta elválik az ér falától, és aktiválódva szabadon keringő sejtként átalakul ún. „gyógyító” MSC-vé. Ez a sejt aztán - a „B” ábrán látható módon - az általa termelt bioaktív anyagok termelése révén egyrészt trofikus, másrészt immunmoduláló aktivitásán keresztül teremti meg regenerációhoz szükséges ideális mikrokörnyezetet. A szövetek helyreállítása után is folytatódik, hogy az aktivált MSC pericytákként visszaépül az eredeti helyére, az érfal abluminális oldalára (Caplan és Correa 2011 nyomán).

Az MSC-k immunmoduláló képességgel rendelkeznek

Részben állatkísérletek, részben a klinikai kipróbálások során derült ki, hogy az MSC-knek két további különleges tulajdonsága is van. Egyrészt allogén (ugyanazon faj genetikailag eltérő másik egyede), sőt néha xenogén (másik faj egyede) recipiensbe oltva sem válnak ki erőteljes, a sejtek kilökődésével járó immunválaszt (Mansilla és

mtsai 2005), azaz hipoimmunogének. Másrészt kifejezett – in vitro és in vivo egyaránt megfigyelhető – immunszuppresszív hatásuk van (Uccelli és mtsai 2006).

A klinikum akkor figyelt fel igazán az MSC-k immunrendszert szabályzó képességére, amikor 2004-ben Le Blanc és munkatársai (Le Blanc és mtsai 2004) az MSC-k *in vivo* gyulladásgátló és immunszuppresszív hatásán alapuló sikeres terápiás beavatkozásról számoltak be. Egy 9 éves, akut lymphoid leukaemiája miatt allogén csontvelő-transzplantációval kezelt kisfiúban rendkívül súlyos (IV. stádiumú, az emésztőrendszert, a bőrt és a májat is érintő) akut *graft versus host* betegség (GVHD) alakult ki. Ezt sikerült leküzdeni a gyermek édesanyjából származó MSC-k ismételt intravénás adásával.

Kimutatták, hogy az MSC-k az immunrendszer minden sejtípusára képesek hatni, legyen szó akár a veleszületett, vagy az adaptív immunitás elemeiről. Hatásuk leggyakrabban a monocyták, dendritikus sejtek, NK sejtek, T és B limfocyták proliferációjának és differenciációjának gátlásán keresztül működik, de gyakran ennek ellenkezője is megfigyelhető. A stroma sejtek képesek citokin termelésük gyors megváltoztatására attól függően, hogy gyulladós vagy gyulladásgátló funkcióra van-e szükség (Hegyi és mtsai 2012, Krampera és mtsai 2011, Uccelli és mtsai 2008).

MSC-k jelenlétében például az aktivált T-sejtek osztódása csökken (Le Blanc és mtsai 2003). Ez elsősorban az immunválaszt segítő (helper) és citoxikus T-sejtek esetében figyelhető meg. Az MSC-k az immunválaszt gátló, regulátor T sejtekre gyakorolt hatása ezzel éppen ellentétes. Az MSC-k részben szolúbilis faktorok segítségével, részben közvetlen sejt-sejt kapcsolaton keresztül fejtik ki hatásukat a T sejtekre.

A dendritikus sejtek (DC-k) kulcsszerepet játszanak mind a saját, mind a nem-saját antigének elleni humorális és sejtes immunválasz szabályozásában. A DC-k csak érett állapotban vesznek részt az immunválasz elindításában, éretlen állapotban kifejezetten gátolják azt. A mesenchymális őssejtek gátolják a DC-k differenciálódását, érését, és működését is (Aggraval és Pittenger 2005, Ramasamy és mtsai 2007). Ezt a fajta gátló hatást is elsősorban szolúbilis mediátorok közvetítik.

Az MSC-k és B limfocyták közti kölcsönhatás funkcionális következményeiről nagyon keveset tudunk. Corcione és munkatársai (Corcione és mtsai 2006) leírták, hogy

emberben az MSC-k gátolják a poliklonálisan aktivált B-sejtek proliferációját és ellenanyag-termelő plazmasejteké történő differenciálódását.

A természetes ölüsejtek (NK sejtek) a veleszületett immunrendszer elemeiként legfontosabb pusztítói a vírussal fertőzött sejteknek és a daganatsejteknek. Az MSC-k gátolják az interleukinokkal indukált NK sejtek proliferációját. Az NK sejtek közvetítette citotoxikus reakció gátlásához pedig a megfigyelések szerint elengedhetetlen a közvetlen NK sejt - MSC kölcsönhatás (Sotiropoulou és mtsai 2006).

Az MSC-k immunmoduláló képességének pontos mechanizmusa még nem teljesen tisztázott, az azonban biztos, hogy a citokin termelésen és a sejt-sejt interakciókon keresztüli szabályozás nagyfokú redundanciát jelent (Aggarwal és Pittenger 2005). A számos sejt típusra kiterjedő és változatos hatásmechanizmussal működő immunregulációs képesség tette az MSC-keket a legígéretesebb jelöltekké az immunrendszer eredetű betegségek gyógyításában (Zhao és mtsai 2010).

Az MSC-keket bemutató fenti 5 pontban láthattuk, hogy az MSC-k méltán keltették fel a klinikum érdeklődését, ugyanakkor számos ponton kérdéseket vetnek fel. A jelenleg folyó, MSC-ekkel kapcsolatos klinikai kísérletek száma 334 (forrás: clinicaltrials.gov). Ezekben a legkülönbözőbb betegségek gyógyítását célozzák, kihasználva a sejtek érképző (Buerger-kór), immunszuppresszív (*graft versus host* betegség), immunmoduláló (szkleózis multiplex, amiotrófiás laterális szklerózis) és regenerációs képességeit (1-es típusú diabétesz). Ezeknek a teszteknek jó része azonban az I-es és II-es klinikai kipróbálási fázisokban tart jelenleg, amely elsősorban a terápia biztonságosságát teszteli.

Ahhoz, hogy az MSC-k bekerülhessenek a mindennapos terápiás gyakorlatba, fontos lenne tisztázni, hogy a felmerült lehetőségek közül pontosan mi az élettani szerepe a sejteknek az élő szervezetben, milyen molekuláris mechanizmusok révén hatnak az immunrendszerre és a regenerációra. Továbbá, hogy biztosak lehessünk abban, hogy a különböző szöveti eredetű MSC-k egyformán, esetleg egymást helyettesítve használhatók-e gyógyításra, továbbá, a sejtek ontogenetikus eredetére vonatkozó ismeretek lennének szükségesek. Utóbbiról szóló ismereteinket, korábbi eredményeket és a felmerülő kérdéseket a továbbiakban ismertetjük.

III. A MESENCHYMALIS STROMA SEJTEK FELTÉTELEZETT FEJLŐDÉSTANI EREDETE

Az MSC-k kialakulására vonatkozó elképzelések

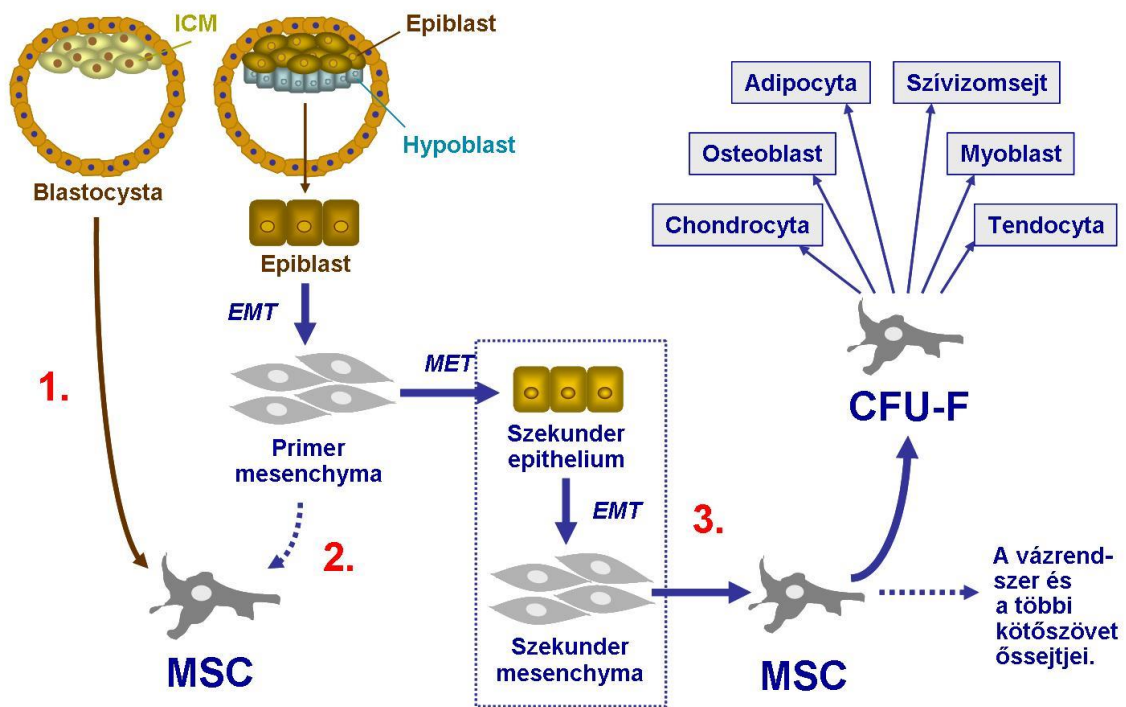
Az MSC-k számos előnyös tulajdonsága – a nagyfokú plaszticitás, az immunszuppresszív hatás, valamint a könnyű izolálhatóság és tenyésztetőség (Uccelli és mtsai 2008, Zhao és mtsai 2010) – az összes többi őssejtípus közül talán a legígéretesebb és legvonzóbb sejtípusá teszi őket a jövőbeli esetleges orvosi célú alkalmazásra. A számos, MSC-kkel kapcsolatos kutatás ellenére azonban mostanáig is csak igen keveset tudunk arról, hogy az MSC-k ontogenikusan honnan is erednek és mi a valódi biológiai funkciójuk *in situ*. Enélkül viszont a humán gyógyászatban való felhasználásuk is kockázatokat rejt magában. A sejtek szervezetben betöltött valószínűleg nélkülözhetetlen szerepének terápiás célú kiaknázásához elengedhetetlen volna megismerni az MSC-k kialakulását és fejlődését az ontogenezis (egyedfejlődés) során. A szakirodalomban nagyon kevés adat van a sejtek eredetére vonatkozóan, és ezek sem egységesek. Alapvetően háromféle elképzelés létezik (2. ábra).

1. Néhány kutatócsoport szerint (Anjos-Afonso és mtsai 2007) a stroma kultúrákban található őssejtek valójában a korai embrionális időszakból változatlanul fennmaradt a kötőszövetekben megbújó pluripotens sejtek. Szerintük a csontvelőben - esetleg számos más szövetben - található egy olyan primitív mesenchymalis progenitor sejt populáció, amely nemcsak a pluripotens sejtekre jellemző molekulákat expresszálja (SSEA-1, Oct-4, Nanog és Rex-1), de differenciációs potenciálja is ennek megfelelően széles. Ezek a sejtek szükség esetén aktiválódva, sejt pótlásra, tehát regeneratív céllal, igen sokféle sejtípus létrehozására képesek.

2. Mások azt állítják, hogy a különböző szövetekben előforduló mesenchymalis őssejtek egy olyan egységes rendszert alkotnak, melynek valamennyi sejtje a primer mesenchymából alakult ki a gastrulációt követően az első EMT (epithelialis-mesenchymalis átalakulás (epithelial to mesenchymal transition) alkalmával. Ezzel kapcsolatban kétféle elképzelés is született:

- Az első szerint az MSC-k egy közös mesodermális eredetű progenitor sejtből, a mesenchymoangioblastból származnak (Vodyanik és mtsai 2010). Vodyanik és mtsai szerint ez egy, a mesodermából fejlődő közös progenitora a mesenchymalis őssejteknek és az endothel sejteknek.
- A másik feltételezés, ami az egységes eredetet alátámasztja az, hogy az MSC-k a vérképző rendszerrel párhuzamosan az AGM (aorta-gonad-mesonephros) régióban alakulnak ki, és a hematopoetikus sejtek vándorlását követve szóródnak szét a szervezetben (Mendes és mtsai 2005).

3. A harmadik tábor azt állítja, hogy a különböző MSC populációk a mesoderma szegmentációja után, az egyes testszelvényekben (talán a somitákban) egymástól függetlenül alakulnak ki, de hasonló funkció(ka)t látnak el az egyes szervekben (vagyis párhuzamos fejlődésről van szó). Ez az esemény az első MET-et (mesenchymalis-epithelialis átalakulás, mesenchymal to epithelial transition) követően, a második EMT után történik, vagyis a sejtek a szekunder mesenchymából fejlődnek. Ezt az elképzelést támasztja alá Bianco munkacsoportja is, akik kimutatták, hogy a vázrendszert (csontvelő, csont, porc) létrehozó és az egyéb szervekben található MSC-k különböző eredetű és jellegű sejtek (Bianco és mtsai 2010). A csontvelőben a vázrendszert létrehozó elődsejtek mellett a vérképzést támogató stroma progenitorai is megtalálhatók, míg a többi szervből izolált adherens sejtek egyéb kötőszöveti progenitorokat tartalmaznak és ezért nem képes a vérképzést *in vitro* sem támogatni.



2. ábra: Az MSC-k kialakulásának feltételezett útvonalai. A szakirodalomban olvasható három fő elképzelés szerint (1) az MSC-k az embrionális korból visszamaradt pluripotens őssejtek, (2) a primer mesenchymából alakultak ki és egy közös őszármazottai, illetve (3) a szekunder mesenchyma kialakulását követően egymástól függetlenül jöttek létre az egyes szegmentumokban, ahol párhuzamosan fejlődtek tovább.

Rövidítések: CFU-F – colony forming unit fibroblast (fibroblastszerű kolóniákat létrehozó sejtek), EMT – epithelial to mesenchymal transition (epithelialis-mesenchymalis átalakulás), ICM – inner cell mass (belső sejtcsoport), MET – mesenchymal to epithelial transition (mesenchymalis-epithelialis átalakulás), MSC – mesenchymal stem cells (mesenchymalis stroma sejtek)

A fenti elméletek által feltételezett MSC fejlődési útvonalak alaposabb megértéséhez szükséges a kérdéses időszakban folyó embriológiai események áttekintése, melyekre a következőkben térünk ki.

Az MSC-k kialakulásának idején zajló embriológiai események áttekintése***A mesoderma kialakulása***

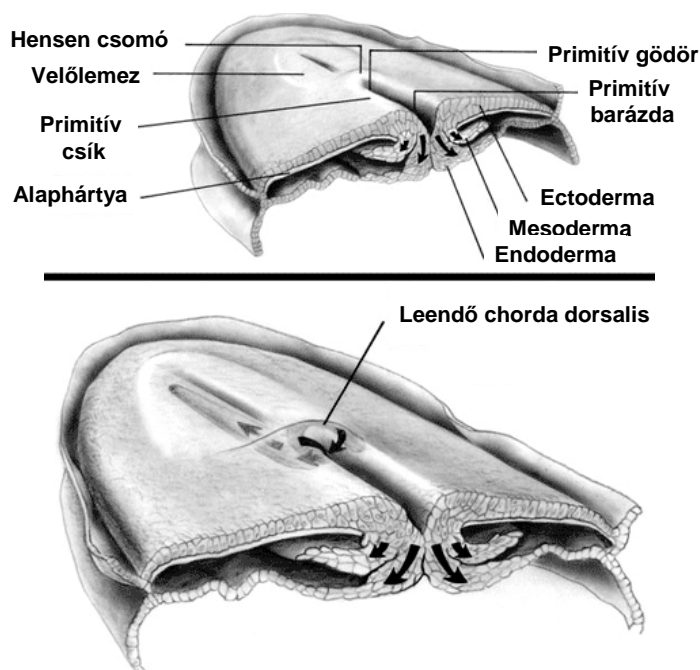
Általánosan elfogadott nézet szerint az MSC-k döntő része mesodermális eredetű, kivéve az arc- és agykoponya csontokban található stromát, amely neuroektodermális eredetű. Ennél részletesebben azonban nincs biztos irodalmi adat a sejtek pontos kialakulási helyéről és idejéről. Eddig csak egy-egy munka jelent meg ebben a témában, és ezek sem mutatnak egységes állásfoglalást (ld. előző pontban kifejtett elméletek).

Az egyes embriológiai események során, többé-kevésbé ismert időrendi sorrendben és testtáj-specifikusan gének átíródása indul meg, más gének pedig bizonyos szakaszokhoz és területekhez köthetően elnémulnak. Az átíródás szabályozásának molekuláris emlékeit, vagyis epigenetikus memóriájukat a sejtek a későbbi fejlődésük során is megőrzik. Identitásuk e fontos elemei az *in vitro* tenyésztés során is feltételezhetően fennmaradnak. Elképzelésünk szerint, e jellegzetes gének, géncsoportok tanulmányozásával, majd átíródásának vizsgálatával különböző eredetű MSC tenyésztéseinkben, hozzájárulhatunk azok fejlődéstani eredetének felderítéséhez.

Mivel a mesoderma kialakulása döntő színhelye a sejtek megjelenésének is, kövessük végig ennek a csíralemeznek sorsát. A mesoderma, vagy harmadik csíralemez a gastruláció folyamata során jön létre, amikor a kétrétegű embriópajzs háromrétegűvé válik. A mesoderma filogenetikus értelemben először a gyűrűsférgék egyedfejlődése során jelenik meg, azonban kialakulásának módjában számos eltérés figyelhető meg a felsőbbrendű gerincesekhez, azon belül is az emlősökhöz képest. A gastruláció sejtszintű eseményei jól ismertek, a folyamat háttérben álló molekuláris mechanizmusok viszont egy igen intenzíven kutatott, de még számos megválaszolatlan kérdést tartogató területe a fejlődésbiológiának.

A gastruláció tanulmányozásában a hagyományos modellállat a csirke, de ma már jól ismerjük a folyamat lépéseit – többek közt – egérben és emberben is. A folyamat csirkében az embrionális fejlődés 18. órájában, emberben a 17-21. napon kezdődik meg. Ennek során az embriópajzs laterális részeiről sejtváándorlás indul a

középsík irányába, ahol ennek hatására egy magvastagodás, benne pedig egy bemélyedés jelenik meg. Mindez az embrió posterior végén indul meg, kialakítva a primitív csomót, más néven a Hensen csomót. Az embrió hossz tengelye mentén előrefelé növekvő bemélyedést pedig primitív csíknak nevezzük. A Hensen csomó és a primitív csík területére érkező sejtek olyan őssejtek, melyek utódai fognak belépni és befordulni (ingresszió) az epiblast (későbbi ectoderma) és hipoblast (későbbi endoderma) sejtréteg közé és képezni a leendő mesodermát (3. ábra).



3. ábra: A gastruláció folyamata emberben.

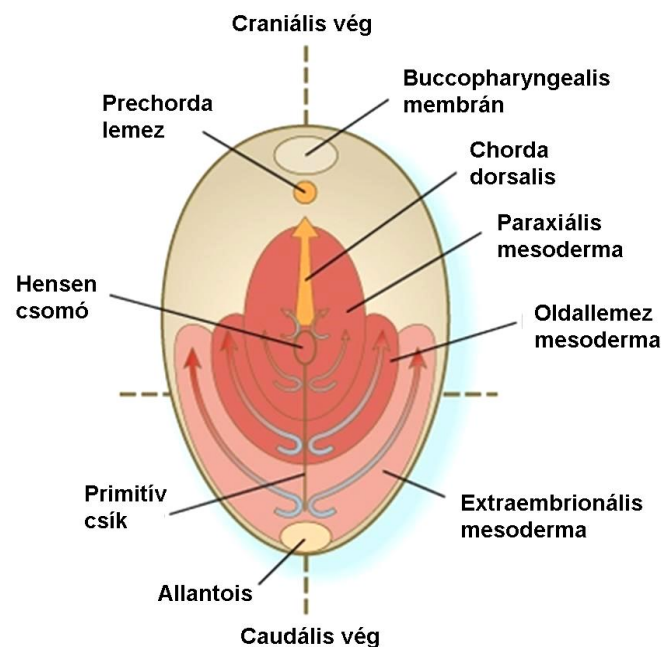
A gastruláció során zajló sejt-vándorlás eredményeképpen megjelenik a primitív csomó (melyén a primitív gödör) és primitív csík (melyén a primitív barázda). A beforduló epiblast sejtek vándorlásának útját a nyilak jelölik (emberi embriópajzs keresztmetszeti rajza az amnionüreg felől nézve) (Sadler TW - Langman Orvosi embriológia c. könyve nyomán).

Egér esetében a primitív csík megjelenése az embrionális fejlődés 6,5. napján (Theiler stage 9) történik. A csirkéhez és az emberhez hasonlóan a primitív csomó az embrió leendő posterior végén jelenik meg. Az epiblast sejtek az ectoderma és a visceralis

endoderma közé fognak bevándorolni, és az embrió végleges endodermáját ezek az ide érkező sejtek fogják alkotni, nem pedig a visceralis endoderma sejtei.

A Hensen csomó területéről a középvonal mentén craniális irányba migráló sejtek hozzák létre a prechorda lemezt és a chorda dorsalist (4. ábra). Eközben a primitív csík területén beforduló sejtek laterálisan és craniálisan vándorolva létrehozzák az embrionális mesodermát. Utóbbi az embrió elülső testfelében a buccopharyngealis membránig, hátul pedig a cloaca membránig található meg (4. ábra).

Az embrionális mesoderma hosszanti irányba három különböző részre osztható (4. ábra). Az első a chorda dorsallisszal párhuzamosan futó paraxiális (középsík melletti) mesoderma. Ez fog szegmentálódni somitákká, és ebből lesz később a tengelyváz, valamint a vázizmok. A paraxialis mesodermától laterálisan jelenik meg az intermediér (közti) mesoderma, más néven gononephrotom, amely a húgy-ivar szervrendszer előfutára. A legoldalsóbb elhelyezkedésű az oldallemez, amely a testfalat és a zsigeri szervek falát fogja alkotni.



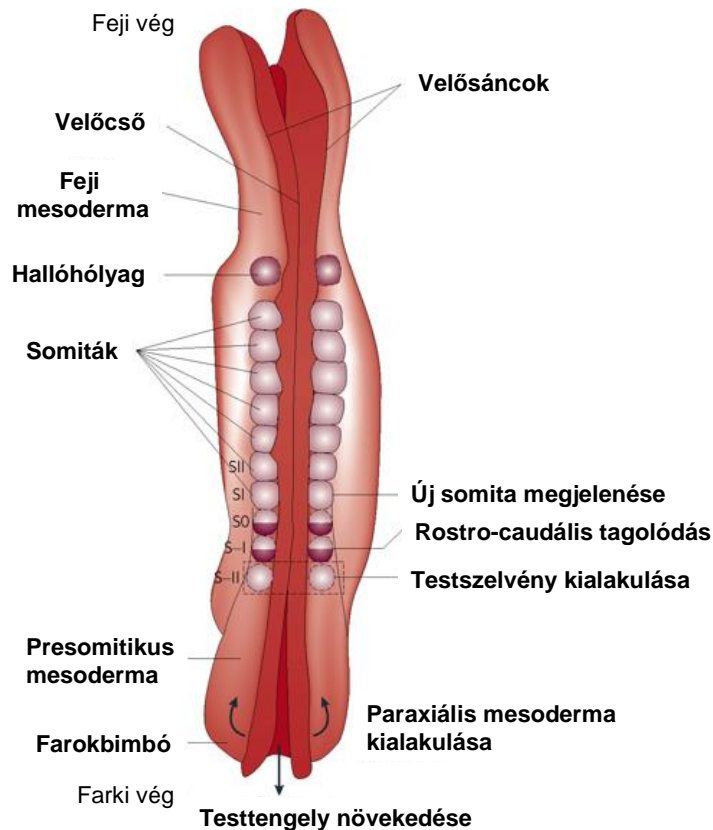
4. ábra: Az embrionális mesoderma három részből épül fel

(Carlson BM: *Human Embryology and Developmental Biology* c. könyve nyomán).

A paraxiális mesoderma feldarabolódása: a somitogenezis

A gastruláció során kialakuló mesoderma három - a további fejlődés során eltérő struktúrákat létrehozó - része közül csak a paraxiális mesoderma szegmentálódik. Ezt a folyamatot nevezzük somitogenezisnek. Ahogyan a paraxiális mesoderma (innenről presomitikus mesodermának nevezik) elkezd feldarabolódni, a belőle létrejövő szegmentumokat somitoméráknak nevezük. Ezekből alakulnak ki később a somiták, vagy őscsigolyák (5. ábra).

Emberben a 25. nap környékén, egérben az embrionális fejlődés 7,5-8. napján (Theiler stage 12) jelenik meg az első pár somit. Ez a 8. somitomérából alakul át, mivel az első 7 pár somitoméra nem képez somitákat, azokból a fej, az arc és a nyak mesodermája fejlődik. Csirkében és emberben összesen 37 pár somit fejlődik, sorrendben a következők: 4 occipitalis, 8 cervicalis, 12 thoracalis, 5 lumbaris, 5 sacralis és 3 coccygealis somitapár. Egérben összesen 56-60 pár somit alakul ki (Aulehla és mtsai 2008), míg ez a szám kígyóban akár több száz is lehet.



5. ábra: Emberi embrió somitái a fejlődés negyedik hetében. A somiták páros megjelenése anterior-posterior sorrendben történik az embrió hossz tengelye mentén. Felülnézeti rajz, a somiták számozása a következő szabályokat követi: S0: az éppen formálódó somitapár, a korábban kialakulókat pozitív (SI, SII), a később formálódókat negatív római számokkal jelölik (S-I, S-II) (Mary-Lee Dequéant és mtsa 2008 nyomán).

A somita az embrionális korban megjelenő átmeneti szövettípus, mesoderma egység. Kialakulása során mesenchymalis-epithelialis átalakulás (MET) történik. Korábban úgy gondolták, hogy a somita egésze átalakul mesenchymalis sejttípusból epithel jellegű sejttípussá, a legújabb elképzelés szerint viszont csak a somita határokat érinti ez a változás. A somiták részt vesznek az embrió struktúrájának újraszervezésében, illetve alapvetőek a test szelvényezettségének létrehozásában. Belőlük jönnek létre ugyanis a támasztószövetek szelvényenként, vagyis a gerincoszlop és a bordák csontjai és porcai (sclerotom), valamint az adott szelvényhez tartozó izomzat (myotom) és kötőszövetes elemek (dermatom).

A sejtek szintjén látott változásokat kísérő molekuláris tényezők mibenléte részben ismeretes, de folyamatosan tűnnek fel újabb szereplők a fejlődés ezen igen eseménydús időszakában. A somita határok létrehozásában szereplő faktorokat például úgy gondoljuk, már ismerjük, de például a somiták egyenletes időbeli megjelenését hajtó mechanizmusok még tisztázatlanok.

A pozicionális információ és a Hox gének kialakulása

A kétoldali szimmetriájú állatok embrionális fejlődésében az első szimmetriabontó esemény az, amikor a 32 sejt blastocysta stádiumban elkülönül egymástól a belső sejtmassza (ICM – inner cell mass) és a trophoctoderma sejtek rétege. Ekkor határozódik meg az embrionális és az azzal szembeni abembrionális pólus. Ezt a folyamatot véletlenszerű események befolyásolják, nevezetesen, hogy az adott időben a sejt éppen milyen pozícióban helyezkedik el.

A gastruláció időszaka is egy igen meghatározó fejlődési szakasz a sejtek ún. pozicionális memóriájának kialakulásában. Ekkor jelennek meg ugyanis az embrió fő testtengelyei. Legelsőként a cranio-caudalis és a medio-lateralis tengelyek helye dől el,

amelyeket a primitív csík pozíciója határoz meg. A jobb-bal oldaliság a primitív gödörben zajló molekuláris események hatására, az ún. gödöráramlás eredményeképpen alakul ki, de a dorsalis és ventralis oldal szintén ebben a korai állapotban determinálódik.

A fejlődés során a sejtekbe „beíródó”, és a későbbiekben is megmaradó pozicionális memória kialakításában részt vevő géneket részben ismerjük, de egyre gyakoribb, hogy régóta ismert génekről fedezik fel, hogy fontos szerepük van ebben a folyamatban. A tengelyek kialakításában szereplő gének emlősökben mind a zigótából származó, ún. zigotikus gének. Az eredetileg ecetmuslicában (*Drosophila melanogaster*) felfedezett és leírt zigotikus gének a szelvényezett testfelépítés kialakításában nélkülözhetetlenek, de a fejlettebb állatcsoportok fejlődésében is megtalálhatók. A gap gének szélesebb paraszegmentumok területén kifejeződő, így a test durvább tagolásáért felelős gének. Finomabb felbontását végzik a testszelvényeknek a pair-rule gének, amelyek néhány sejt sor szélességben íródnak át. A szegmentumoknak ennél is pontosabb elkülönítését végzik a szegment-polaritás gének, lehetővé téve a szomszédos sejtsorok közötti különbségek megjelenését. A szelvények közötti különbségek kialakításáért felelősek a homeobox (Hox) régiót tartalmazó gének.

A Hox gének jellemzése és funkciója

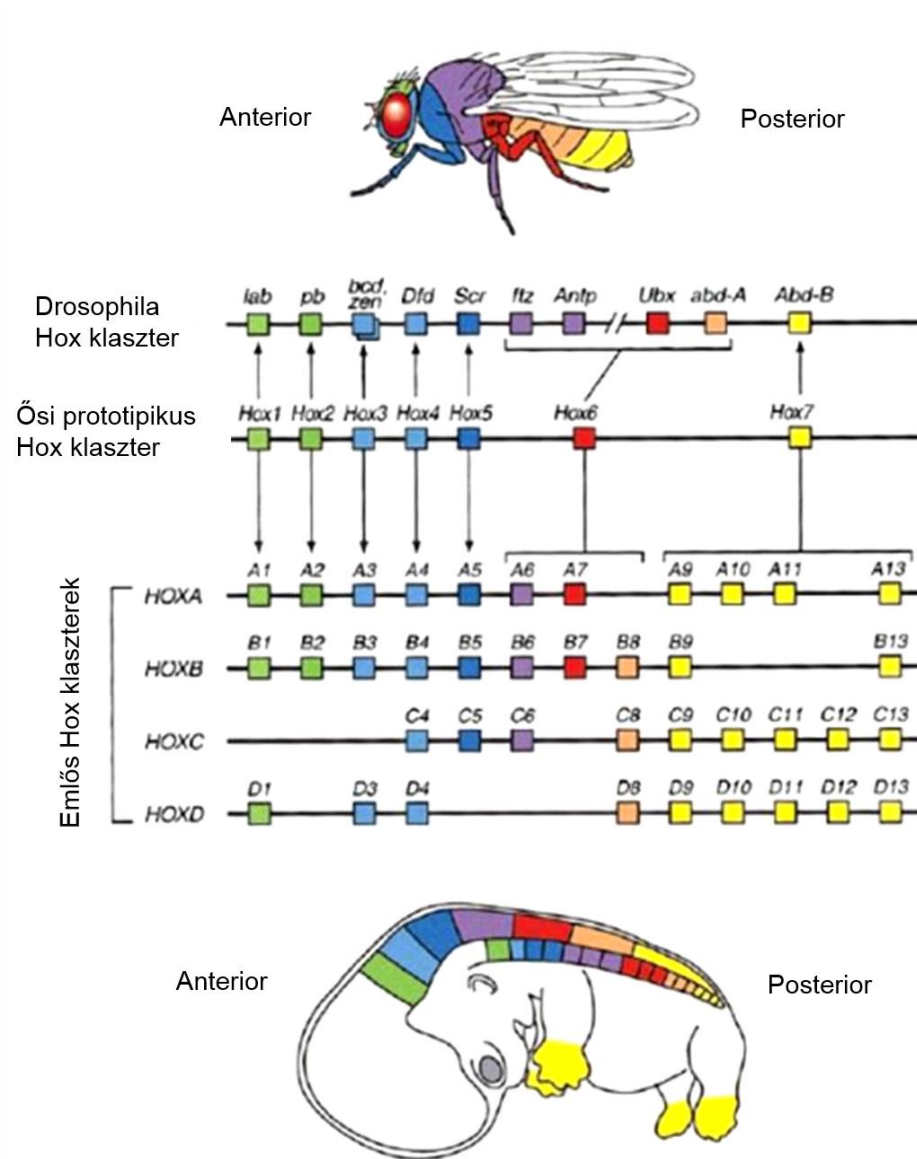
A transzkripciós faktoroknak – funkcióját tekintve – egyik legfontosabb típusa a *homeodomén* régióval rendelkező fehérjék családja. Ezekre az jellemző, hogy a DNS-hez való specifikus kötődésük révén a génexpresszió szabályozásában játszanak fontos szerepet (Levine és Hoey 1988). A homeodomén egy evolúciósan erősen konzervált, 60 aminosavból álló hélix-hurok-hélix térszerkezetű funkcionális egység, ami a szekvencia-specifikus DNS-kötésben játszik szerepet (Scott és mtsai 1989). Ezt a homeodomént egy 180 bázispárból álló génszakasz kódolja, melyet *homeobox* régiónak nevezünk. Az erről a régióról elnevezett homeobox (Hox) géneket először a *Drosophilában* írták le, mint az antennapedia és bithorax komplexek alkotóit.

A Hox génekről átíródó transzkripciós faktorok az embrionális fejlődés során olyan gének kifejeződését szabályozzák, amelyek elsősorban a szöveti morfogenezisért

felelősek, például növekedési faktorokat, sejtadhéziós molekulákat, szignalizációs molekulákat, és extracelluláris mátrix fehérjéket kódolnak. A Hox gének a fejlődés korai szakaszában irányítják a szövetek megfelelő mintázatképzését, nélkülözhetetlenek az állat hosszanti tengelyének kialakításában, valamint az embrionális testszelvények és hozzájuk tartozó függelékek, például végtagok létrejöttében, és elsősorban a testtájak közötti különbségek kialakításában (Duboule és Dolle 1989, McGinnis és Krumlauf 1992).

A Hox gének jellegzetessége, hogy a genomban csoportokba, ún. klaszterekben rendeződve helyezkednek el. A Hox klaszterben az egymást követő gének szekvenciáinak nagyfokú hasonlósága arra enged következtetni, hogy a klaszter egy ősi gén sorozatos tandem duplikációjának eredményeként jöhetett létre (Garcia-Fernandez 2005). Gerinctelen állatokban (és így a *Drosophilában* is) a Hox gének egyetlen csoportba szerveződtek, míg a gerincesben négy-hét Hox klaszter található, amelyek részben átfedő funkciót látnak el (Amores és mtsai 1998). Emlősökben 4 klaszterben összesen 39 Hox gén található, melyek 13 paralóg csoportba rendeződtek 3'-5' irányban. A különböző fajok homológ kromoszómarégióinak azonos pozíciójában található géneket ortológoknak nevezzük, ezek szekvenciái és funkciója igen hasonló. A klaszterekbe rendeződött, klasszikusnak is nevezett Hox géneken kívül a genomban elszórtan fellelhető homeobox tartalmú gének a ParaHox gének. Ezeket funkcionális és szerkezeti tulajdonságaik alapján lehet családokba sorolni, például ilyenek a Cdx vagy a Pbx gének (Garcia-Fernandez 2005). A homeodomén fehérjéknek több mint 1000 típusát azonosították eddig a különböző fajokban, ezeknek döntő része ParaHox gén.

A Hox klaszterek működésére jellemző a kolinearitás, vagyis a homológ gének klaszterekben való elhelyezkedésének és az aktivációs/funkcionális doménjeik működésének az összefüggése (McGinnis és Krumlauf 1992, Iimura és Pourquie 2007). A Hox klaszter 3' végén található gének elsőként és a test elülső részében fejeződnek ki az egyedfejlődés egy korai szakaszában (az elülső testtájak azonosságának meghatározásában játszanak szerepet), míg a klaszter 5' végén lévő gének működése időben később és a test hátulsó részében nyilvánul meg (tér- és időbeli kolinearitás) (6. ábra). A Hox géneknek ezen tér- és időbeli szekvenciális aktiválódása teszi lehetővé, hogy a szegmentált struktúrák - mint a gerinc, a végtagok vagy pl. az emésztő- és szaporító szervrendszerek - a megfelelő helyzetben fejlődjenek.



6. ábra: A kolinearitás elvének szemléltetése ecetmuslicában és emberben. A Hox komplex 3' végén elhelyezkedő gének időben korábban és térben előrébb fejeződnek ki a test hossz tengelye mentén, mint a klaszter 5' végén találhatóak. Az egyes gének kifejeződésének sorrendje pedig a kromoszómákon elfoglalt helyzetüknek megfelelően történik. Az ortológok gének azonos színnel vannak jelölve, kifejeződésük helye az ugyanazon színnel jelölt testtáj. *Drosophila*-ban egyetlen Hox klaszter található, alatta látható az ősi Hox klaszter, legalább pedig az emlősök/ember 4 Hox klasztere, amelyet klasszikus Hox géneknek is nevezünk: HOXA, HOXB, HOXC és HOXD család (Veraksa és mtsai 2000 nyomán).

A Hox géneknek az adott sejtre jellemző egyedi kombinációja az ún. *Hox kód*, amely lehetővé teszi a sejt identitásának megállapítását, megléte ugyanis egy életen át tartó pozicionális információt hordoz az adott sejt eredeti elhelyezkedéséről (Gruss és Kessel 1991, Knittel és mtsai 1995). Például fibroblastokban kimutatták, hogy – a test bármely pontjáról izolálva őket – egyedi Hox gén mintázatuk alapján anatómiai eredetük pontosan beazonosítható (Rinn és mtsai 2006). Ez azt bizonyítja, hogy a Hox kód epigenetikailag rögzített és tovább örökíthető.

2. Célkitűzések

A jövő sejterápiás eljárásainak rendkívül ígéretes sejtípusai a szinte minden szervünkben előforduló mesenchymalis ős-, vagy stroma sejtek (mesenchymal stem/stromal cells, MSC-k), mivel jelentős szerepet játszanak a szövetek megújulásában, és különböző mechanizmusokon keresztül szabályozzák – általában gátolják – az immunrendszer működését is.

Jellemzőiket és működésüket azonban eddig főleg a csontvelőből – első izolálási helyükről – származó stroma sejteken vizsgálták. Kérdés, hogy a más forrásból származó MSC-k mennyiben különböznek csontvelői társaiktól, és mi lehet az esetleges különbségek jelentősége a majdani sejterápiás beavatkozások során?

Ezért szerettük volna elvégezni a modellállatként választott C57Bl/6 egerek különböző szerveiből – csontvelő, zsírszövet, lép, thymus és aorta fal – izolált MSC vonalak összehasonlító vizsgálatát.

1. Elsőként felnőtt (2-3 hónapos) és fiatal (14 napos) C57Bl/6 egerek különböző szerveiből 6 adherens stroma sejt vonalat állítottunk elő, és arra a kérdésre kerestük a választ, hogy ezek a sejtek felszíni markereik és *in vitro* differenciálódási képességük alapján valóban MSC-knek tekinthetők-e? Ha igen, akkor teljesen azonos-e a sejt felszíni antigén mintázatuk, illetve differenciálódási képességük, vagy vannak-e kisebb különbségek a különböző szervekből származó MSC-k között?

2. A következő lépésben azt vizsgáltuk, hogy vannak-e eltérések a különböző MSC vonalak génkifejeződési mintázatában, különös tekintettel a sejtek esetleges pozicionális memóriájára utaló *Hox*, valamint további, az ontogenezis során kulcsszerepet játszó – ugyancsak homeotikus szelektor domént tartalmazó – transzkripciós faktorokat kódoló génekre? Ennek alapján rendelkeznek-e a különböző eredetű MSC-k pozicionális memóriával, azaz a sejttenyésztésben is „emlékeznek-e” arra, milyen volt az anatómiai lokalizációjuk *in vivo*?

3. Lehet-e eredményeinkből az MSC-k eredetére és fejlődésére vonatkozó következtetéseket is levonni? Kifejeznek-e a különböző szervekből izolált MSC-k az adott szervre jellemző, illetve annak fejlődése során nélkülözhetetlen transzkripciós faktorokat is?

3. Anyagok és módszerek

3.1. A mesenchymális őssejtek izolálása és tenyésztése

Az MSC-k izolálását Peister és munkatársai (Peister és mtsai 2004) által kidolgozott módszerrel, néhány apróbb, már korábban leírt módosítással (Hegyi és mtsai 2010), illetve a különböző szöveti forrásokra alkalmazva végeztük. Az állatokat gyors, kíméletes nyakcsigolya diszlokációval áldoztuk fel (Budapest Fővárosi Állategyészségügyi és Élelmiszer Ellenőrző Állomás által megadott etikai engedély ügyszám: 830/003/Föv/2006). Ezt követően felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6 egerekből kivettük a combcsontokat és a zsírszövetet, valamint fiatal (2 hetes) C57Bl/6 állatok combcsontjait, lépét, thymusát és aortáját is eltávolítottuk.

A **combcsonatok** velőürét fecskendő segítségével komplett tenyésztőfolyadékkal (CM) átfújtuk, és az így kimosott sejteket a CM-mal felszuszpendáltuk. Az itt használt CM összetétele a következő: DMEM/F12 médium (Dulbecco által módosított Eagle/Ham-féle F12 tartalmú médium) (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), 10% foetális borjú szérum (FCS), 5% ló szérum (Invitrogen), 50 U/ml penicillin, 50 µg/ml streptomycin (Sigma-Aldrich), 2 mM L-glutamin (Invitrogen), kiegészítve heparinnal 5 U/ml végső koncentrációban. A velőürből kimosott sejtek szuszpenzióját egyenként 25 cm² letapadási felületet nyújtó tenyésztő edényekbe (BD Falcon, Bedford, MA, USA) osztottuk 2-4x10⁶ sejt/cm² sűrűségben. Az edényeket ezután 72 órára 37 °C-os hőmérsékletű, nedves, 5 %-os CO₂ atmoszférát biztosító termosztátba helyeztük. A le nem tapadt sejteket 72 óra elteltével egy öblítéssel és a tápfolyadék cseréjével eltávolítottuk. Az adherens sejteket 3-4 naponként friss tápfolyadékkal láttuk el, miközben azok osztódtak és benőtték a tenyésztőedény alját. A kultúrákról 3-4 hét múlva - amikor az adherens sejtréteg összefüggővé (konfluenssé) vált - eltávolítottuk a tápfolyadékot, majd PBS-ben mostuk. Ezt követően 0,25 %-os tripszin-EDTA oldattal (Gibco) 5 percig, 37 °C-on inkubáltuk a tenyészeteket. A tripszines inkubáció hatására a sejtek leváltak az edény felszínéről. Az emésztést FCS hozzáadásával állítottuk le. Ezután szérummentes médiumban 10 percig tartó, 1200-as percenkénti fordulatszámú végzett centrifugálás (mosás) következett, majd egy 75 cm²-es tenyésztő edénybe (BD

Falcon) 1:5 hígításban szélesztettük a sejteket. A későbbi átoltások hasonlóan történtek. A tenyészetekből a hematopoetikus sejtek (CD45+, CD34+ és /vagy granulocytamakrofág kolóniaképző sejtek) a 6., 7. átoltással teljesen eltűntek. A sorozatos osztódások során a vérképző sejtek eldifferenciálódtak és előregedtek. Az előregedő sejtek nem adherensek, így azokat a tenyésztőfolyadék rendszeres cseréjével eltávolítottuk.

A lép, thymus és aorta fali sejteket mechanikai aprítással és passzírozással nyertük ki. A törmelékek eltávolítására egy 60 µm lyukátmérőjű hálón szűrtük át a sejtes szuszpenziót, majd Hanks' oldatban (összetétele: 0.137 M NaCl; 5.4 mM KCl; 0.25 mM Na₂HPO₄; 0.1 g glükóz; 0.44 mM KH₂PO₄; 1.3 mM CaCl₂; 1.0 mM MgSO₄; 4.2 mM NaHCO₃) történő centrifugálással kétszer megmostuk. A sejtek szuszpenzióját a csontvelői sejtek szuszpenziójával azonos módon kezeltük: szélesztettük tenyésztő edényekbe, majd a konfluens tenyészeteket többször átoltottuk, azért, hogy az adherens sejtek morfológiailag homogén kultúráit nyerjük.

A hasi és lágyéki zsírszöveteket a kimetszésük után foszfáttal pufferált sóoldatban (phosphate-buffered saline, PBS) alaposan megmostuk. Ez két-három alkalommal, egy 600-as fordulatszám mellett végzett, 8 percen át tartó centrifugálással történt. Ezt követően 0.1% kollagenáz (Sigma-Aldrich) tartalmú PBS-ben, plate rázató automatára helyezve, 250 percenkénti rotáció mellett, 37°C-on emésztettük a szövetet 30 percen át. Az érett zsírsejteket és a kötőszöveti részeket az emésztés végeztével 1200 rpm mellett 10 percig történő centrifugálás után elöntöttük, a visszamaradt pellet az ún. stromalis vasculáris frakció (SVF), mely - többek között - a mesenchymalis stroma sejteket is tartalmazza. Újraszuszpendálva az SVF-et még egy mosást végeztünk PBS-ben. Az újabb szuszpendálást követően a továbbiakban ugyanúgy jártunk el a szélesztés és a tenyésztés során, mint a többi stroma sejt kultúra esetében.

Az így nyert MSC tenyészetek gyakorlatilag végtelen ideig fenntarthatók (immortalizált sejtvonalak). Kísérleteinket 10-15 alkalommal átoltott, a hematopoetikus szennyező elemektől mentes, de még jól differenciálódó sejtekkel végeztük.

3.2. Polimeráz láncreakció (PCR) alapuló vizsgálatok

PCR Array módszer géncsoportok átíródásának egyidejű vizsgálatára

Minden egyes MSC sejtvonalat egymástól függetlenül három különböző állatcsoportból nyertük ki azért, hogy három valódi, biológiai párhuzamos mintán végezhessük el a gének vizsgálatát. A három különböző állatcsoportból, egymástól függetlenül alapított sejtvonalak, különböző anatómiai eredetű sejttípusaira, három külön PCR Array analízist végeztünk. A tizedik és tizenötödik átoltás közötti konfluens kultúrák sejtjeit TRI REAGENT™ (Sigma-Aldrich) hozzáadásával lizáltuk. Az RT² qPCR-Grade RNA Isolation Kit (SA Biosciences, Frederick, USA) segítségével, a gyártó utasításait követve a sejtek teljes RNS tartalmát izoláltuk. Az izolált RNS tisztaságát a Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) spektrofotométerrel ellenőriztük. Ezt követően minden mintából 1,5 µg-nyi teljes RNS kivonatot RT² First Strand Kit (SA Biosciences) segítségével cDNS-be írtunk át. Az így nyert cDNS szolgált aztán kiindulásul a SYBR® Green alapú, RT² SYBR Green qPCR Master Mixet (SA Biosciences) használó, valós idejű (real-time) PCR méréseinkhez. A cDNS-ek amplifikációját Roche Light Cycler 480 készülékkel végeztük, úgy, hogy a 10 perces, 95°C-on végzett polimeráz aktiválást 40 olyan ciklus követte, melyekben 15 másodpercig tartó, 95°C-os denaturálás és 1 perces 60°C-os amplifikáció váltotta egymást. A gyártó utasításait követve 84-84 gént vizsgáltunk meg a RT² Profiler PCR Array-ken, a *Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array* és a *Mouse Homeobox Genes PCR Array* (SA Biosciences) (1. és 2. kiegészítő táblázat) segítségével.

A PCR array 5 különböző háztartási gént tartalmazott, melyek közül – a gyártó ajánlása szerint – kiválasztottuk azt az egyet, amelynek a Ct értéke a legkevésbé tért el a minták között a mérések során. Így esett a választásunk a Hprt1 génre (hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1). Az összes, array-vel végzett mérés során erre a génre normalizáltunk.

Kvantitatív valós idejű PCR (qRT-PCR) egyes gének átíródásának vizsgálatára

A PCR Array mérések során kapott küszöbciklus értékek egy részét kvantitatív valós idejű PCR módszerével, egyedi primerek segítségével is megmértük. Kiindulásként az MSC-k teljes RNS tartalmát PBS-sel történő mosást követően, TRI REAGENT™ (Sigma-Aldrich) hozzáadásával nyertük ki, a gyártó utasításait követve. Minden mintából egységesen 0,5 µg RNS-t írtunk cDNS-be a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems; Foster City, CA) felhasználásával és a hozzá mellékelt utasítások szerint. A qRT-PCR méréseket az Eppendorf Mastercycler ep *realplex4* berendezésen végeztük, úgy, hogy a 10 perces, 95°C-on végzett enzimaktiválást 40 olyan ciklus követte, melyekben 20 másodpercig tartó, 95°C-os denaturálás és 65 másodpercig tartó 60°C-os amplifikáció váltotta egymást. Az MSC-k *Nanog*, *Pou5f1*, *Zfp42*, *Brachyury*, *Klf4*, *Acta2*, *Gata4*, *Gata6* és *Nkx2.5* génjeiről származó transzkriptumok mennyiségét ebben az esetben a partner laboratóriumban (Gödöllőn) használatos *Gapdh* háztartási génre normalizáltuk (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Az egyes génekre specifikus primerek katalógusszámai a 3. *kiegészítő táblázatban* találhatóak.

3.3. Az adatok elemzése

A különböző szövetekből származó MSC-eket egymással kívántuk összehasonlítani, ezért választanunk kellett egy kontroll sejtípust közülük. Mivel az MSC-eket először a csontvelőben írták le és ezekről a sejtekről van a legtöbb információ a szakirodalomban, így a választásunk a fiatal egerek csontvelőjéből izolált MSC-kre esett. A másik 5 kísérleti sejtípus génkifejeződési adatainak elemzése során az mRNS mennyiségének viszonyszámát (fold change = hányszoros a változás) a $\Delta\Delta C_t$ módszert használva kalkuláltuk ki. Elemzéseink során az SA Biosciences weboldal (<http://sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>) kínálta mintaelemzés példájára támaszkodtunk. A relatív mRNS szintek átlagértékeit a három független kísérlet eredményeiből számoltuk ki. A statisztikai elemzést az SPSS 13.0 programmal végeztük és a Kruskal-Wallis tesztet használtuk. Az eredményt akkor tekintettük szignifikánsnak, ha a *P* értéke kisebb volt, mint 0,05.

3.4. A PCR eredmények validálása a fehérje kifejeződés szintjén

Áramlási citometria

A génkifejeződést fehérje szinten is igazolni kívántuk. A 3.1 alatt részletezett tripszines módszerrel felszedett MSC-eket 5×10^5 sejtet tartalmazó mintákra osztottuk. Ezt követően a sejteket fikoeritrinnel (PE) konjugált, egér CD31, CD34, CD44, CD73, CD90.2 elleni, vagy biotinnal konjugált, egér CD45R/B220 elleni monoklonális antitesttel (BD Pharmingen, San Diego, CA, USA), 30 percen át 4°C-on jelöltük. Az utóbbi esetben második reagensként PE-el jelölt streptavidint (Sigma-Aldrich) alkalmaztunk. A megfestett sejteket PBS-ben mostuk, majd analizáltuk FACScan flow citométerben a CellQuest software segítségével (Becton-Dickinson, Mountain View, CA).

Immunfluoreszcencia

A sejteket 4%-os, PBS-ben oldott paraformaldehiddel fixáltuk és 0,5%-os, PBS-ben oldott Triton X-100-al permeabilizáltuk, majd 1%-os, PBS-ben oldott BSA-ban blokkoltuk. A sejt kultúrákat 50-szer hígított, kecskében termeltetett anti-Mkx, anti-Pitx1, anti-Tbx5, anti-En2 és nyúlban termeltetett anti-Hox11/Tlx1 (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA) ellenanyagokban inkubáltuk egy éjszakán át 4°C-on. A kötődött ellenanyagokat NL557 fluorokrómmal jelölt, számarban termeltetett, kecske elleni IgG-vel (R&D Systems, Minneapolis, USA), ill. kecskében termeltetett, nyúl elleni IgG-vel (Invitrogen) mutattuk ki, 1 órás inkubációval, 1/200-as hígításban. A negatív kontrollokat az első ellenanyag elhagyásával mértük (eredményét nem mutatjuk). A fotókat Olympus IX51 fluoreszcens mikroszkóphoz kapcsolt (Olympus, Tokyo, Japan) SPOT RT3 fényképezőgéppel (Burroughs, MI, USA) és a SPOT 4.6 software-rel készítettük.

Western blot

Az MSC-eket a szokásos módon feltripszineztük, majd jéghideg PBS-ben mostuk. A mosást jelentő centrifugálást követően a sejteket tartalmazó csapadékot a következő összetételű, nem ionos detergenst tartalmazó lízis pufferben reszuszpendáltuk: 25 mM HEPES, 1% Triton X-100, 5 mM KCl, 0,5 mM MgCl₂, 1mM DTT (dithiothreitol), 1 mM PMSF (phenylmethanesulfonylfluorid). A lízis puffert 2×10^7 sejt/ml mennyiségben alkalmaztuk. Ezt követően szeparáltuk a citoplazmatikus fehérjéket és az intakt sejtmagokat egy 13 000 g-n, 15 percen át folytatott centrifugálással. Az így nyert, ún. nukleáris pelletet redukáló loading pufferben oldottuk, majd néhány percen át forraltuk. A 8×10^5 sejtől nyert magi fehérjéket megfuttattuk a 7.5-12%-os SDS-PAGE gélen (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság), majd nitrocellulóz membránra vittük át. A nitrocellulóz membránra kötött fehérjéket azonnal blokkoltuk TBS-Tween 20-ban oldott zsírmentes tejjel. Ezután a membránt kecskében termeltetett, anti-Tbx5-IgG-vel (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA) inkubáltuk, majd második ellenanyagként torma peroxidázzal jelölt, szamar, anti-kecske IgG ellenanyagot (Santa Cruz Biotechnology) alkalmaztunk. A specifikus kötődést erősített kemilumineszcens eljárással detektáltuk (Amersham ECL Plus, GE Healthcare) a gyártó utasításait követve. Az egyenes felvitel próbájaként a membránt Re-Blot Plus Solution-nel kezeltük (Millipore), melyet torma-peroxidázzal konjugált, az ubikvitinált magfehérjékre (PCNA) specifikus ellenanyaggal tettünk láthatóvá (Santa Cruz Biotechnology).

Citokin fehérjék kimutatása felülúszóból

A hat különböző szöveti eredetű, konfluens MSC kultúra felülúszójában a következő citokinek jelenlétét vizsgáltuk meg a Mouse Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray Kit (SABiosciences) segítségével: Il-1a, Il-1b, Il-2, Il-4, Il-6, Il-10, Il-12, Il-17A, Ifn- γ , Tnf- α , G-Csf és GM-Csf. A reakció leállítása után - a gyártó utasításait követve - a fényelnyeléseket 450 és 570 nm-en olvastuk le. A citokinek jelenléte okozta fényelnyelésbeli különbségeket a negatív kontroll abszorbanciájához viszonyítva határoztuk meg.

3.5. A mesenchymalis őssejtek plaszticitásának vizsgálata

Csont irányú differenciáltatás

Az osteoblast irányú differenciálódást Pittenger módszere (Pittenger és mtsai 1999) alapján végeztük. A konfluens MSC tenyészeteket olyan komplett médiumban tartottuk két héten át, amelyet hidrokortizonnal, β -glicerofoszfáttal, és aszkorbinsavval (valamennyi a Sigma-Aldrich-tól) egészítettünk ki. Az ún. oszteogén médium pontos összetétele a következő: DMEM, 10% FCS, 10mM β -glicerofoszfát, 50 μ g/ml aszkorbinsav, 10^{-8} M hidrokortizon, 2mM L-glutamin, 100 IU penicillin és 50 μ g/ml sztreptomycin. A pH (7,2) beállításához NaHCO_3 -t használtunk. A differenciáltatás során a médiumot 3-4 naponta cseréltük a tenyészeteken. Két hét elteltével az extracellulárisan lerakódott kalcium kristályokat Alizarin vörös festékkel (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá és inverz mikroszkóp alatt vizsgáltuk (Olympus CK2, Olympus Optical Co., Tokió, Japán) és digitális kamerával rögzítettük (Nikon Coolpix 4500, Tokió, Japan).

Zsírsejt irányú differenciáltatás

Az adipocita irányú differenciálódás kiváltására Pittenger szerint (Pittenger és mtsai 1999) jártunk el. A konfluens MSC kultúrákat olyan CM-ban tenyésztettük két héten át, amelyet dexametazonnal és 3-izobutil-1-metilxantinnal (IBMX) (Sigma-Aldrich) egészítettünk ki. Ennek az ún. adipogén médiumnak a pontos receptje: DMEM/F12, 10% FCS, 10^{-7} M dexamethazone, 0,5 mM IBMX, 100 IU penicillin és 50 μ g/ml streptomycin. A pH (7,2) beállításához NaHCO_3 -t használtunk. A médiumot a differenciáltatás során 3-4 naponta cseréltük a tenyészeteken. Ezt követően a sejteket 10%-os formalinban fixáltuk és olajvörös (Oil Red O, Sigma-Aldrich) festékkel festettük, majd inverz mikroszkópban vizsgáltuk (Olympus CK2).

3.6. Az aorta falí MSC-k vérképzés-támogató képességének vizsgálata

Dexter típusú kokultúra

Az aortafal eredetű adherens sejteket egy – zöld fluoreszcens fehérjét kódoló - harmadik generációs lentivírus vektorral (RRL-PPT.SF91) fertőztük meg (melyhez Dr. M. Grez, Frankfurt, Németország szíves felajánlása révén jutottunk). A fertőzött sejtpopuláció mintegy 80-90%-a fejezte ki a citoplazmában a GFP-t. A GFP+ aorta eredetű sejteket 5-10-szeres többségben lévő, frissen kinyert csontvelői sejtek jelenlétében, Dexter és Testa (Dexter és Testa 1976) által előzőleg leírt körülmények között - ún. Dexter kultúrában - tenyésztettük. Két hét elteltével a tenyészetek sejteiben a GFP és egyes leukocita marker gének (CD45R, CD11b, Gr1) együttes kifejeződését FACS mérésel vizsgáltuk.

Osteoclast irányba történő differenciáltatás

Az aortafal eredetű MSC-k tápfolyadékát hat napon át 10^{-8} M 1.25 (OH)₂ D3 vitaminnal (Supelco, Bellefonte, PA) kezeltük, elérve így a JAo-MSK osteoclast irányú differenciálódását. A tartarát rezisztens savas foszfátáz enzim tartalmú (TRAP pozitív) osteoclastokat az Acid Phosphatase Leukocyte Kit (No. 386) (Sigma-Aldrich) segítségével mutattuk ki, a gyártó utasításait követve. Pozitív kontrollként frissen kinyert csontvelői sejteket használtunk.

A vérképző rendszer *in vivo* betelepülésének vizsgálata

Az aorta eredetű sejtek *in vivo* repopulációs képességét transzplantációs kísérlettel vizsgáltuk meg. Recipiensként felnőtt C57Bl/6 egereket használtunk. A myeloablatív besugárzás egy dózisban, ¹³⁷Cs-forrásból származó, 80 cGy/perc intenzitású γ -sugárzással történt az Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Intézetben. A besugárzást követően az állatokat 2×10^6 aorta eredetű sejttel transzplantáltuk. Pozitív kontrollként 10^6 frissen preparált csontvelői sejtet, negatív kontrollként 50 μ l sejtmentes PBS-t adtunk intravénásan.

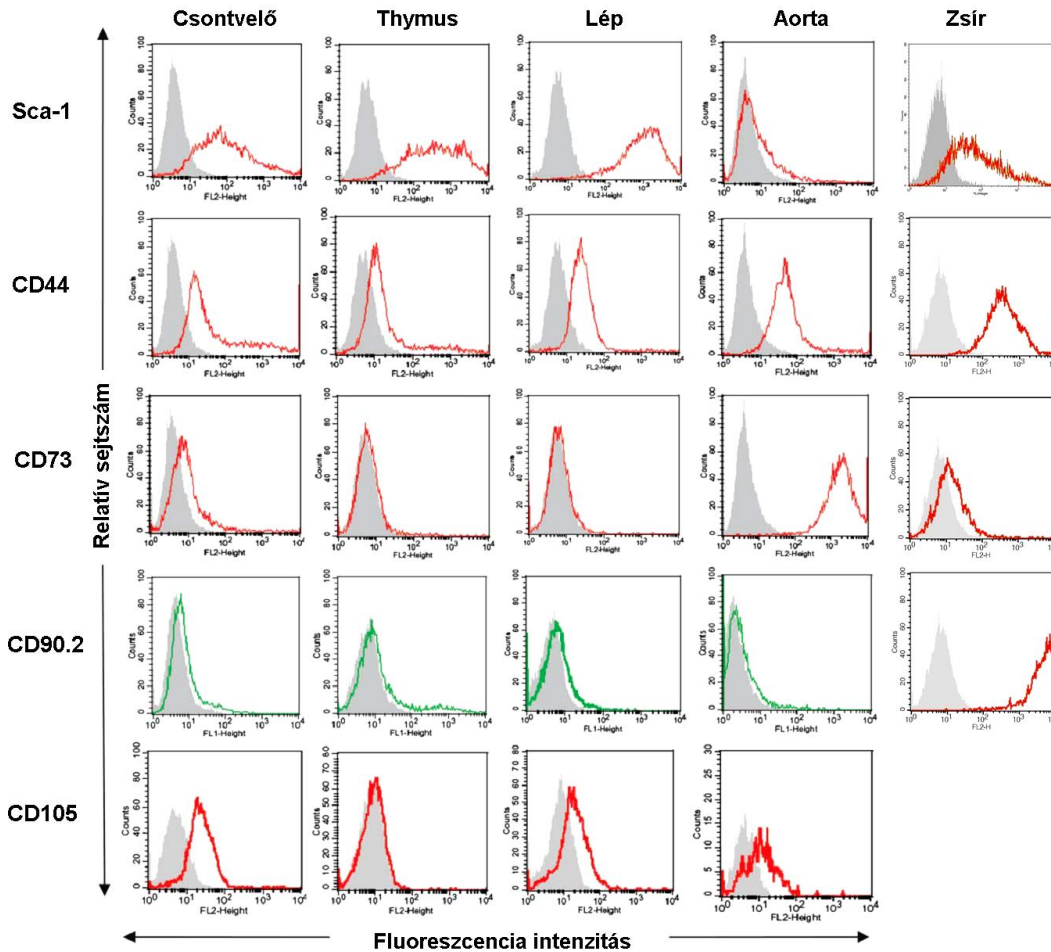
4. Eredmények

4.1. Mesenchymalis stroma sejtek izolálása egér különböző szöveteiből, szerveiből

Első lépésként 10-12 hetes felnőtt C57Bl/6 egerek csontvelőjéből (Csv-MSc) és zsírszövetéből (Zs-MSc), valamint 14 napos C57Bl/6 egerek csontvelőjéből (JCsv-MSc), thymusából (JThy-MSc), lépéből (JLp-MSc) és aorta falából (JAo-MSc) adherens stroma sejteket nyertünk ki, és belőlük sejt kultúrákat hoztunk létre. Mivel a tenyészetek a 6-7. átoltásig az adherens sejteken kívül tartalmaznak még vérképző őses progenitor sejteket, valamint a belőlük képződött érett vérsejteket, ezért csak a 10. passzálás után kezdtünk el dolgozni velük és a 15. átoltásig használtuk őket. Az egér MCS kultúrákra az jellemző, hogy a sejtek általában nem kerülnek a replikatív szeneszcencia állapotába, vagyis gyakorlatilag korlátlan ideig tenyészthetők *in vitro*.

4.2. Sejtfelszíni markerek vizsgálata

A 10. átoltást követően megvizsgáltuk az MSC-k azonosítására szolgáló felszíni molekula mintázatot. Az áramlási citometriás mérések szerint az általunk izolált MSC populációk pozitívak Sca-1-re és CD44-re, kivéve az JAo-MSc-t, ami Sca-1-ből, és a JThy-MSc-t, ami CD44-ből jóval kevesebbet fejez ki. A CD73 a JCsv- és JAo-MSc-ken, míg a CD105 a JCsv-, JLp- és JAo-MSc-ken található meg a legnagyobb mennyiségben. A CD90.2 jelenléte pedig a Zs-MSc-kben volt igen szembetűnő, míg a többi szervből származó MSC-ben alig fejeződik ki (7. ábra). Hozzá kell tenni, hogy CD90.2 pozitívitas egér sejtekben inkább a korai átoltások alatt jellemző, illetve hosszabb tenyésztés során csak túlságosan nagy sejtsűrűség esetén. Hasonló tendencia figyelhető meg a CD73 expressziójában is a kultúrák hosszú távú fenntartása során. Ezzel szemben az Sca-1 molekula kifejeződése egy ettől eltérő változást mutat, ugyanis expressziója - az átoltások számának növekedésével - fokozatosan emelkedik (az adatokat nem mutatjuk).



7. ábra: Egér különböző szerveiből izolált adherens stroma sejtek immunfenotípusa.

A csontvelő (Csv-), thymus (Thy-), lép (Lp-) és aortafal (Ao-) eredetű sejtekből létrehozott sejt kultúrákon az MSC-kre jellemző felszíni molekulákat vizsgáltuk áramlási citometriával a 10-12. átoltás után. Az áramlási citometriás hisztogramokat egyedi antitest jelöléssel kaptuk (színes vonalak), amelyek jelét a megfelelő izotípus kontrollhoz (szürkére festett területek) viszonyítottuk.

A fehérjékifejeződés mellett a gének szintjén is információt akartunk kapni az MSC „markerek” jelenlétéről vagy hiányáról az egyes MSC populációkban. Az 1. táblázatban jól látható, hogy a PCR Array-vel kapott eredmények igen jól tükrözték az áramlási citometriás mérések adatait. Vagyis az összes forrásból származó stroma sejt egyaránt

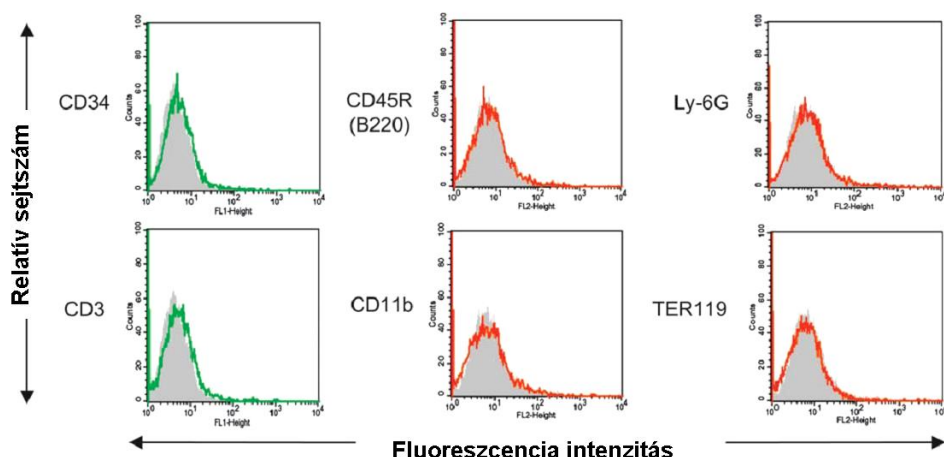
nagy mennyiségben fejez ki *Cd44* mRNS-t. Továbbá a *Cd73* génje kiemelkedően magas (150-szeres) expressziót mutat a JAo-MSK-kben, illetve a *Cd90.2* gén kb. 5700-szoros mennyiségben van jelen a Zs-MSK-kben a JCsv-MSK-vel összehasonlítva.

	Ct érték (JCsv-MSK)	Relatív mRNS expresszió				
		Csv- MSK	Zs- MSK	JAo- MSK	JLp- MSK	JThy- MSK
<i>Cd44</i>	24,95	5,03	3,86	2,51	4,35	2,79
<i>Cd73</i>	29,08	1,09	1,35	150,12	0,38	0,67
<i>Cd90.2</i>	34,69	2,04	5752,61	1,82	1,53	18,38

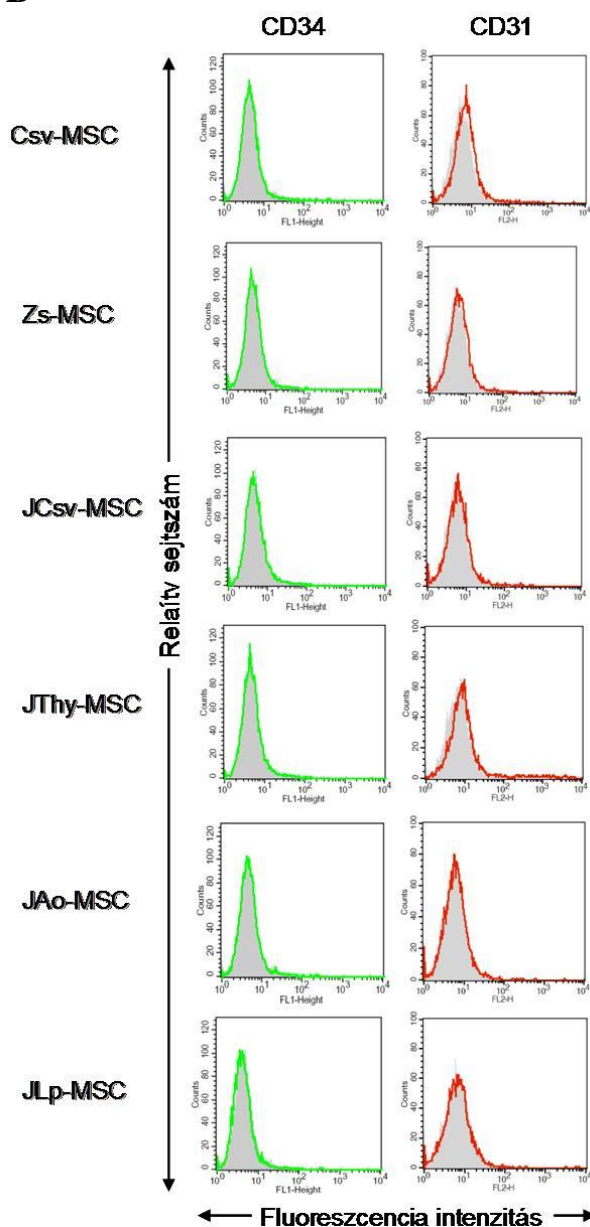
1. táblázat: Sejtfelszíni molekulák géneinek kifejeződése a különböző szervekből izolált MSK-kben (*Mouse Mesenchymal Stem Cells PCR Array*-vel kapott eredmények). A 6-féle MSK kultúrából a fiatal állatokból származó csontvelői MSK-eket (JCsv-MSK) választottuk referenciának. A JCsv-MSK-ben az egyes gének (*Cd44*, *Cd73*, *Cd90.2*) esetében mért küszöbciklus (Ct) értékeket a táblázatban sárga cellákban tüntettük fel. A relatív mRNS kifejeződés a másik 5 MSK populációban a JCsv-MSK-kben mért Ct értékekhez képest van tehát meghatározva.

Továbbá, egyik általunk vizsgált MSK populáció sem fejez ki olyan hematopoetikus markereket, mint a CD34, CD3e, CD45R/B220, CD11b, Ly-6G és a TER-119 fehérjék, illetve az endothel sejtfajlódási sorra jellemző CD31 molekulát sem (áramlási citometriás mérések alapján, 8. ábra ill. a többi eredményt nem mutatjuk). Ugyanakkor, a stroma sejt tenyészetek egyike sem hozott létre granulocytá-makrofág, erytroid- vagy kevert vérképző sejt kolóniákat lágy gélben (az adatokat nem mutatjuk), vagyis azt mondhatjuk, hogy mentesek mindenféle vérképző és endothel elemtől.

A



B



8. ábra: A különböző szervekből származó MSC-k nem fejeznek ki a vérképző és endothel sejtekre jellemző marker molekulákat (áramlási citometriás eredmények).

(A) Csontvelői MSC-ken a 6 fő vérképző sejt marker egyike sem mutatható ki.

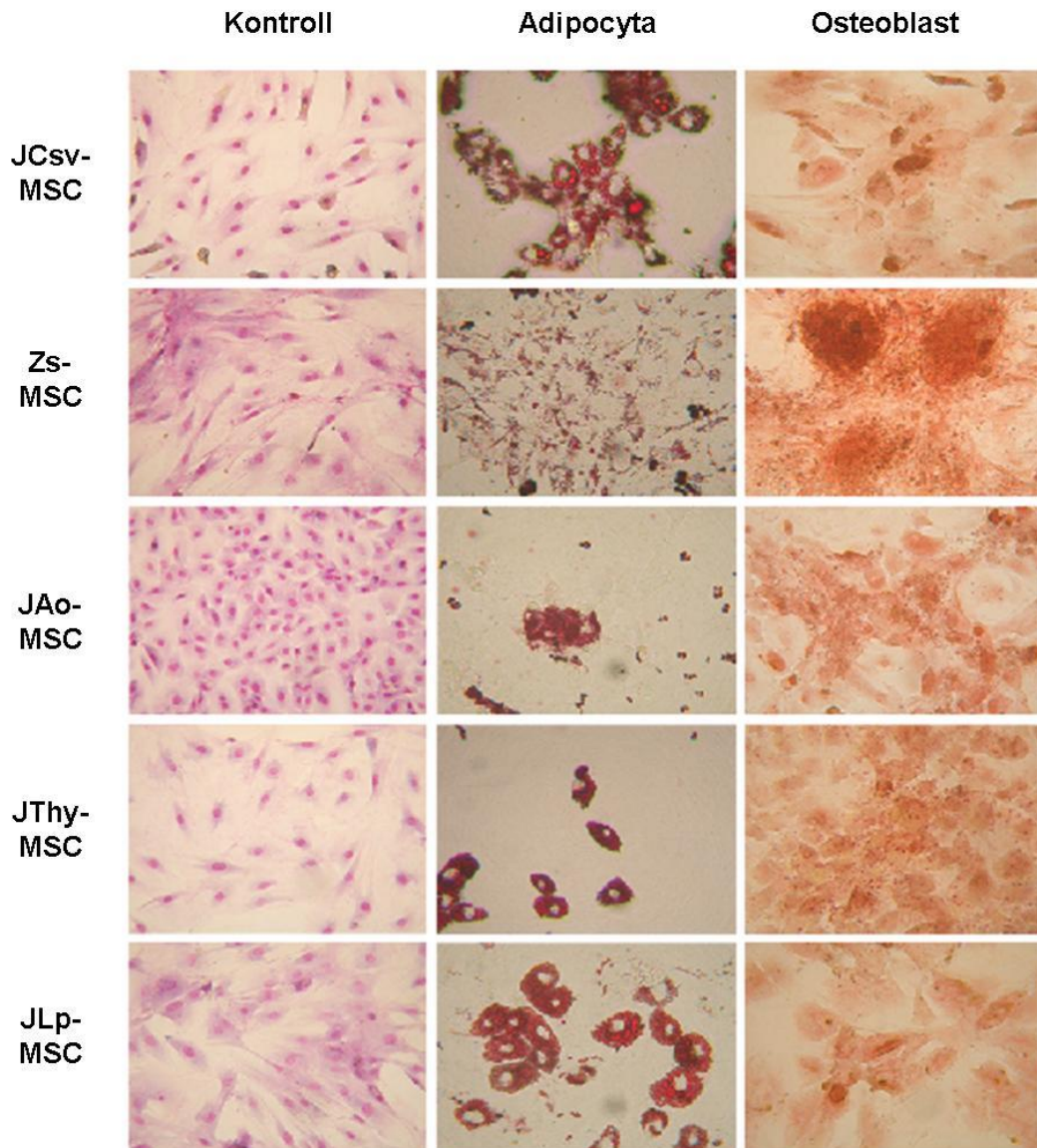
(B) A korai vérképző sejtekre jellemző CD34 fehérje és az endothel progenitorok markere, a CD31 molekula egyik forrásból származó MSC-n sem található meg.

A hisztogramokon az egyedi antitest jelöléseket színes vonalakkal ábrázoltuk, és azokat a megfelelő izotípus kontrollhoz (szürkére festett területek) hasonlítottuk.

Rövidítések: Csv – felnőtt csontvelő; Zs-MSC – felnőtt zsírszövet; JCsv – juvenilis csontvelő; JThy – juvenilis thymus; JAo – juvenilis aorta; JLP – juvenilis lép; MSC – mesenchymalis őssejt.

4.3. A sejtek plaszticitásának vizsgálata

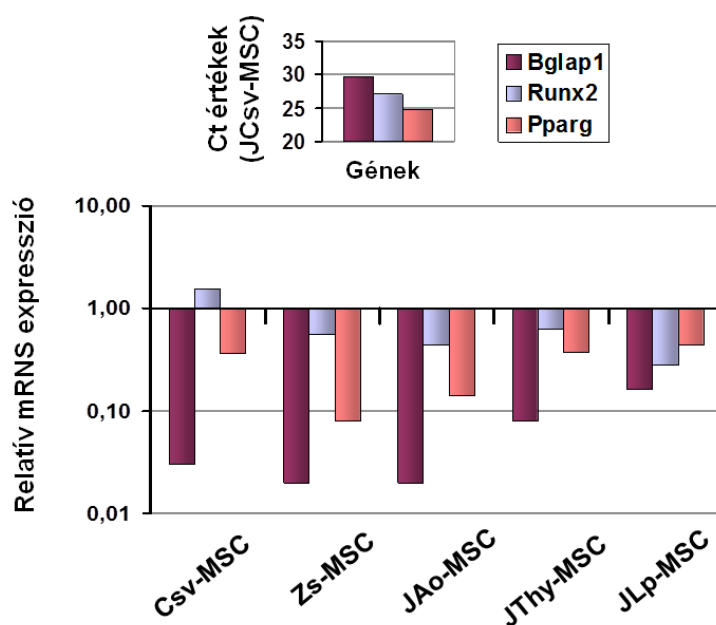
Azt, hogy a stroma kultúráink valóban multipotens sejtekből állnak-e úgy vizsgáltuk meg, hogy speciális tenyésztési körülmények között tartva mesodermális sejttípusok irányába differenciáltattuk el őket. Zsír irányú differenciálódást elősegítő tenyésztőközegben tartva az MSC-eket, azok bizonyos idő elteltével intracellulárisan lipidcseppeket halmoznak fel (9. ábra), míg a csont irányú differenciálódás során a sejtek a közöttük lévő térben kalciumban gazdag mineralizált mátrixot hoznak létre (9. ábra). Ezzel egyértelműen bizonyítható, hogy MSC tenyészteteink multipotens tulajdonságú sejtekből állnak. A különböző szövetekből származó MSC-k esetén azonban eltéréseket tapasztaltunk ezen differenciálódási képességben. A csontvelői, thymus és lép eredetű sejtek könnyedén, míg az aorta fali MSC-k nehezen hoznak létre adipocytákat. Továbbá, a thymus sejtek jóval kisebb mennyiségű ásványos mátrixot hoznak létre a csontvelői, lép és aorta fali sejtekhez képest. Ugyanakkor, nagy sejtsűrűség esetén spontán is bekövetkezik zsírsejt irányú differenciáció a csontvelői és lép eredetű MSC tenyésztetekben (ennek eredményét nem mutatjuk).



9. ábra: A különböző szövetekből származó MSC-k eltérő differenciálódási képességgel rendelkeznek. Kontrollként 10-12. átoltásból származó, fixált és Giemzával festett MSC-k használtunk, ezek morfológiáját az első oszlopban mutatjuk (fénymikroszkópos felvétel). Az MSC-k adipogén irányú differenciációja során keletkező lipidcseppeket olajvörös festéssel tettük láthatóvá, míg az osteogén irányú differenciációt a lerakódott kalcium kristályok kimutatásával bizonyítottuk (alizarin vörös festés). Nagyítások: az eredeti 10-szerese (kontroll, osteoblastok) és az eredeti 40-szerese (adipocyták).

Az osteogén, valamint az adipogén differenciálódásában szerepet játszó gének közül a *Runx2*, *Pparg* és osteokalcin (*Bglap1*) jelenlétét vizsgáltuk meg PCR módszer

segítségével. Azt találtuk, hogy az első két gén valamennyi MSC típusban hasonló mértékben fejeződik ki (10. ábra), viszont az osteokalcin (*Bglap1*) transzkriptumai a JCsv-MSC-kben jóval meghaladták a többi MSC-ben mért mennyiséget ($P=0,011$). Meg kell jegyezni, hogy a vizsgált MSC sejtvonalak egyes génekre vizsgált mRNS értékei a 10. és a 15. átoltás között nem változtak sem az átoltások számával, sem attól függően, hogy melyik átoltás utáni fagyasztásból vettük fel őket (adatokat nem mutatjuk).



10. ábra: Csont és zsír irányú differenciálódásában szerepet játszó gének kifejeződése az MSC-kben. Natív stroma sejt kultúrákban az osteoblast irányú differenciálódás alatt aktív Runx2 és *Bglap1* gének, valamint a zsírsejt irányú átalakulásban nélkülözhetetlen *Pparg* gén kifejeződése hasonló mintázatot mutat a 6-féle MSC kultúrában (kvantitatív PCR Array mérések eredményei). A 6-féle MSC kultúrából a JCsv-MSC-t választottuk referenciának, és a bennük mért küszöbciklus értékekhez (Ct) hasonlítottuk a másik 5 MSC minta Ct értékeit. A felső diagramon láthatók a JCsv-MSC-kben az egyes gének esetében mért Ct értékek. Az alsó diagram pedig a JCsv-MSC-khez képesti génkifejeződés változásokat („up- vagy downregulációkat”), vagyis a relatív mRNS kifejeződést szemlélteti a többi MSC kultúrában (logaritmusos skála). Az adatok 3 független kísérlet eredményeiből származnak.

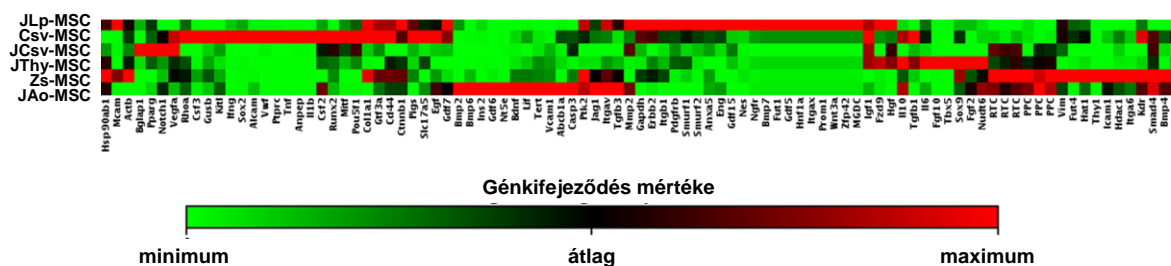
Bármilyen, MSC-kel történő munkának alapvető feltétele a sejtek valódi MSC voltának a bizonyítása. Az áttekinthetőség kedvéért egy táblázatban (2. táblázat) foglaltuk össze a kísérleteinkben felhasznált és 6-féle különböző szövetből izolált MSC minta karakterizálását (sejtfelszíni markereit és differenciálódási képességét).

	MSC eredete				
	Csontvelő	Thymus	Lép	Aorta fal	Zsír
Sejtfelszíni markerek					
Sca-1	+++	+++	+++	+	++
CD44	++	+	++	++	+++
CD73	+	-	-	+++	+
CD90.2	-	-	-	-	+++
CD105	++	-	+	+	+
CD34	-	-	-	-	-
„Lineage” markerek (CD3e, CD45R, CD11b, Ly-6G, TER-119)	-	-	-	-	-
Pericyta/myofibroblast marker α -SMA	40–60%	40–60%	40–60%	~100%	40-60%
Differenciáció					
Adipogén irányú	+++	+++	+++	+	+
Oszteogén irányú	+++	+	+++	+++	+++

2. táblázat: A különböző szervekből izolált MSC-k karakterizálása.

4.4. A különböző szöveti eredetű MSC-k génkifejeződési mintázatainak összehasonlítása citokinekre, növekedési faktorokra, csont morfogénikus fehérjékre és sejtadhéziós molekulákra nézve

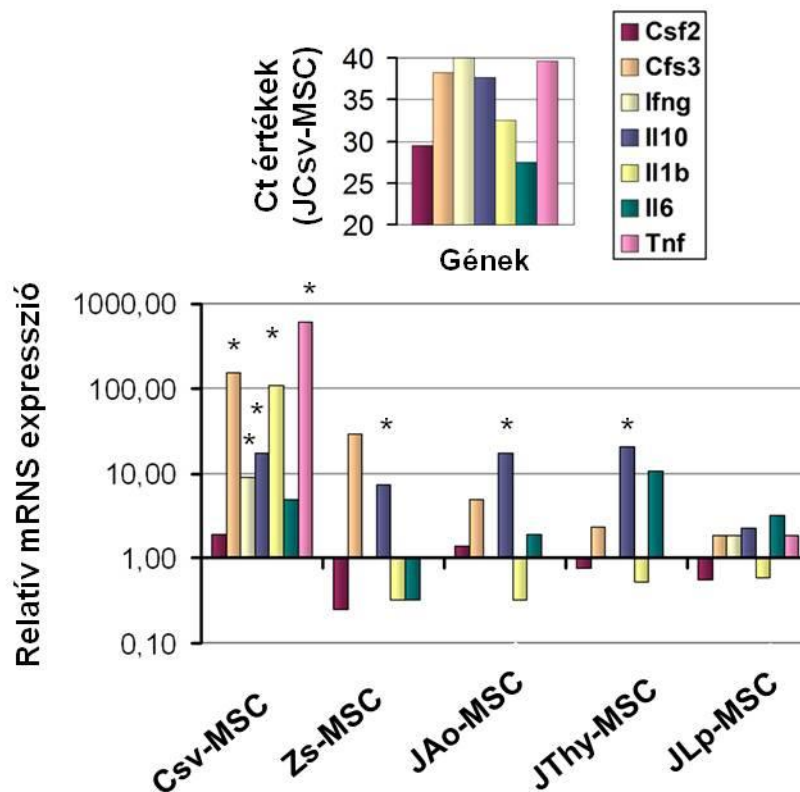
A különböző MSC sejtpopulációk mRNS értékeit a Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array (11. ábra) segítségével határoztuk meg. Az így kapott nyers adatokat (Ct értékeket) először egy háztartási génre (*Hprt1*) normalizáltuk, majd a 14 napos állatok csontvelőjéből izolált MSC-k (JCsv-MSC) értékeihez hasonlítottuk, így kaptuk az ábrán szereplő relatív mRNS értékeket. Az eredeti Ct értékek az 1. kiegészítő táblázatban találhatóak.



11. ábra: A Mouse Mesenchymal Stem Cells PCR Array-vel végzett mérések eredményéből létrehozott hő térkép 84 gén relatív kifejeződését ábrázolja. Minden egyes oszlop egy adott gén relatív expressziós szintjét jelöli a különböző szövetekből származó MSC mintákban. A piros szín a normalizáláshoz használt háztartási génhez – jelen esetben a *Hprt1*-hez - viszonyított nagyobb mennyiségű mRNS szintet jelöli, míg a zöld szín az ehhez képesti csökkent kifejeződést mutatja. A vízszintes sorokban az eltérő szöveti forrásból származó MSC-k találhatóak, és bennük a 84 vizsgált gén kifejeződési mintázata olvasható le.

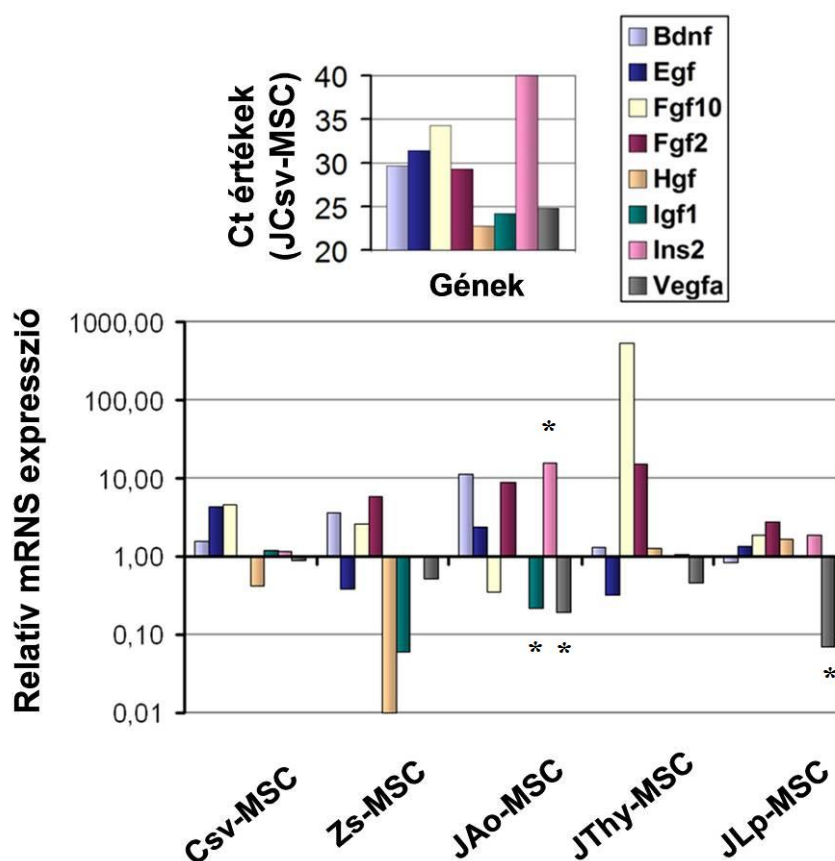
A 12. ábrán mutatjuk be a citokinek kifejeződésére vonatkozó eredményeket. Az *Il-6*-nak és a GM-CSF-nek (*Csf2*) megfelelő transzkriptumok valamennyi MSC mintában jelentős mennyiségben megtalálhatóak. Maga az *IL-6* és a GM-CSF fehérje kimutatható volt a sejtek felülúszójában is a Mouse Inflammatory Cytokines Multi-Analyte ELISArray Kit segítségével (adatokat nem mutatjuk). A *Csf3* ($P=0.034$) és az *Il10*

($P=0.026$) gének viszonylag magas expressziót mutattak valamennyi MSC sejtvonalba, ha a JCsv-MSC-eket vesszük viszonyítási alapnak. A felnőtt csontvelő eredetű MSC-k kitűntek a többi közül, ami a citokineket kódoló mRNS-ek kifejeződését illeti, hiszen a *Csf3*, *Il-1b* ($P=0.007$), *Ifng* ($P=0.013$) és a *Tnf-a* ($P=0.007$) mRNS-ek ezekben voltak a legdominánsabbak. Mindazonáltal a fenti gének fehérjetermékeit nem mutattuk ki a felnőtt egerek csontvelőjéből izolált MSC-k (Csv-MSC) felülűszójában.



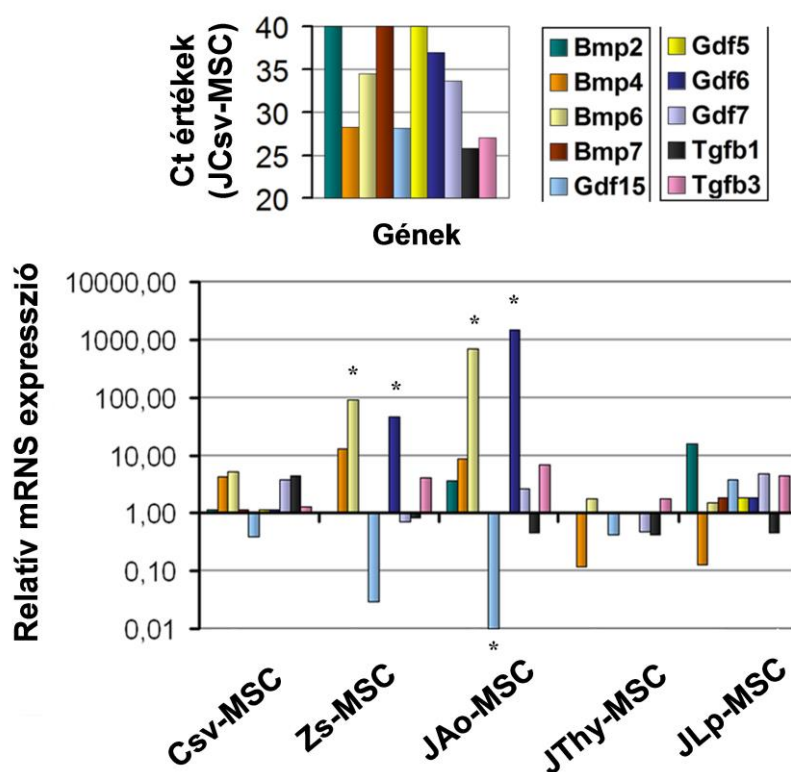
12. ábra: A különböző szervekből izolálható MSC-k citokin gén expressziós mintázata. A kvantitatív PCR eredmények szerint az *Il6* és *Csf2* mRNS-ei igen nagy mennyiségben vannak jelen mindegyik stroma sejt kultúrában. Ugyanakkor a *Csf3*, *Ifng*, *Il10* és *Tnf* gének a JCsv-MSC-kben alig mutathatók ki (felső diagram), és ugyanez elmondható a további 5 MSC mintára is (lásd az alsó diagramon: relatív mRNS expressziók).

Az elemzésbe bevont növekedési faktorok kifejeződése meglehetősen sejttípus-függőnek bizonyult (13. ábra). A legfeltűnőbb eltérést az insulin II (*Ins2*) esetében találtuk, mivel ez a gén csak a JAO-MSK-kben ($P=0.009$) volt kimutatható jelentősebb mennyiségben. A fiatal egerekből származó csontvelői MSC-k (JCsv-MSK) esetén azt mértük, hogy kifejezik a hepatocita növekedési faktor (*Hgf*), az ér endoteliális növekedési faktor A (*Vegfa*), az agyi neurotrofikus faktor (*Bdnf*), és a fibroblast növekedési faktor 10 (*Fgf10*) mRNS-ét. Ezzel szemben a zsírszövet eredetű MSC-kben nem sikerült detektálnunk *Hgf*-et és *Igf1*-et. Az aorta- és a lép-eredetű MSC-k pedig jóval kevesebb *Igf1*-et (JAO-MSK-re, $P=0.017$) és *Vegfa*-t (JAO-MSK-re és JLP-MSK-re $P=0.013$) kódoló mRNS-t fejeztek ki, mint a JCsv-MSK-k.



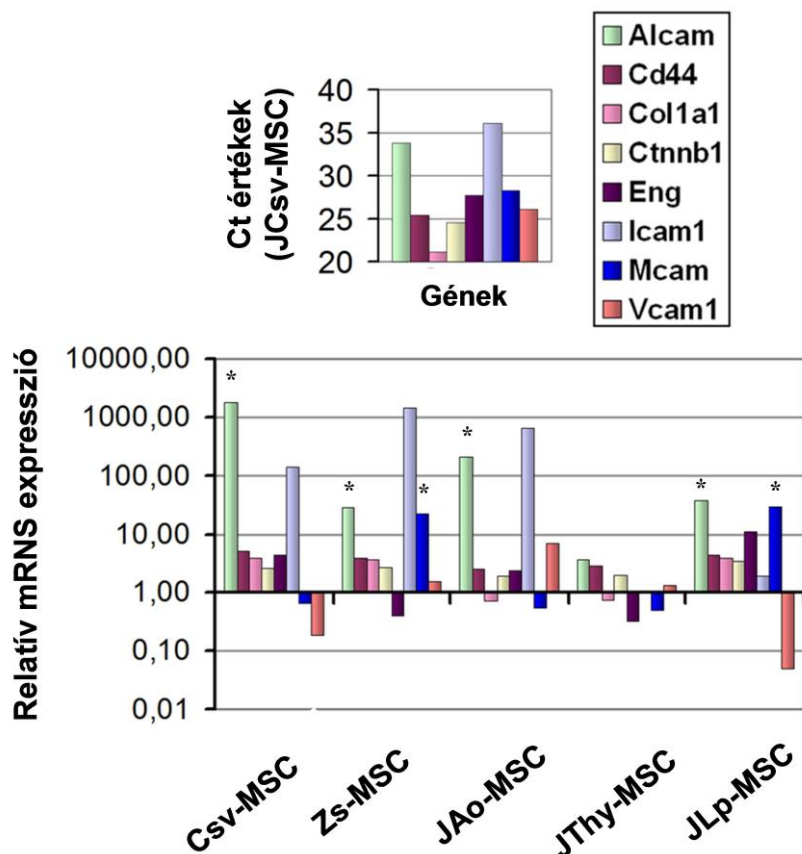
13. ábra: Az MSC kultúrák növekedési faktor gén kifejezése. A vizsgált 8-féle növekedési faktor gén kifejeződésének mértéke általánosságban hasonlóan mondható (*Igf1*, *Vegfa*, *Bdnf*, *Fgf2*, és *Egf*), bár egyes sejttípusokban némi eltérések voltak mérhetőek.

A csont morfogenetikus fehérje (BMP) család tagjainak kifejeződésének tekintetében a különböző MSC csoportok között eltéréseket tapasztaltunk. A BMP-4 és a transzformáló növekedési faktor béta 1 és 3 (*Tgfb1*, *Tgfb3*) kódoló gének hasonló mértékben voltak kimutathatók a különböző MSC vonalakban. Ugyanakkor a növekedési differenciációs faktor 15 (*Gdf15*) átíródása a JCsv-MSC-kben mérthez képest lényegesen alatta maradt az aorta eredetű sejtekben ($P=0.017$), és kisebb mértékben, de hasonlóan csökkent kifejeződést mutatott a zsírszövet eredetű sejtekben. Másfelől a JAo-MSC-k és az Zs-MSC-k nagyobb mennyiségben fejeztek ki át *Gdf6*-ot (BMP-13) ($P=0.036$) és *Bmp6*-ot ($P=0.033$), mint a többi MSC sejt vonal (14. ábra). Megjegyzendő itt, hogy a BMP-13 kifejeződése erősen gátolja a csont irányú differenciálódást, főleg a mátrix mineralizációját (Shen és mtsai 2009), úgyhogy egyáltalán nem meglepő, hogy az aortafalból és a zsírszövetből származó sejtek esetében magas mRNS kópiaszámot találtunk.



14. ábra: A BMP család génjeinek kifejeződésében nagy mennyiségi különbségek találhatók a 6-féle forrásból származó MSC mintában. Míg a Bmp4, Tgfb1 és Tgfb3 mRNS-ek az összes mintában nagy kópiaszámban van jelen, míg a Bmp-6 és Bmp-13 mRNS a JCsv-MSK-khez képest megemelkedett a JAo-MSK-kben és a Zs-MSK-kben.

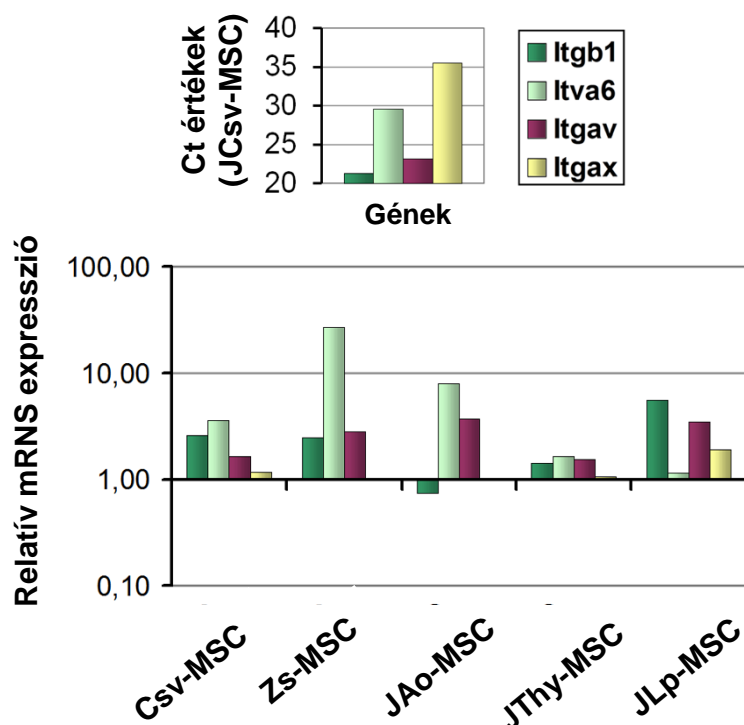
Különböző sejtadhéziós molekulák és integrinek átíródásának mértékét is bevontuk vizsgálatainkba. Ezek közül a *Cd44*, a β -catenin (*Ctnnb1*), az I típusú kollagen α -lánca (*Coll1a1*) és az endoglin (CD105) (*Eng*) a különböző eredetű MSC vonalakban hasonló mértékben íródott át (15. ábra). Az intracelluláris adhéziós molekula 1-et (CD54) (*Icam1*) kódoló mRNS-t nem tudtuk kimutatni a JCsv-MSK-kben és a JThy-MSK-kben, ugyanakkor a többi sejtvonalonban a következő csökkenő sorrendben megtaláltuk: Zs-MSKs > JAo-MSKs > Csv-MSKs > JLP-MSKs (15. ábra). Az aktivált leukocita sejtadhéziós molekula (CD166) (*Alcam*) mRNS-e valamennyi MSC populációban jelen volt, de ezekben jelentős kópiaszám eltérést mutatott. A legtöbb ilyen mRNS-t a Csv-MSK-kben, a JAo-MSK-kben, a Zs-MSK-kben és a JLP-MSK-kben találtuk (P=0.010) (15. ábra). A melanoma sejt adhéziós molekula (CD146) (*Mcam*) és a vaszkuláris sejt adhéziós molekula 1 (CD106) (*Vcam1*) mRNS-e csaknem valamennyi sejt típusban hasonló mennyiségben fordult elő. Ez alól kivételt jelentett a magasabb *Mcam* kifejeződés a Zs-MSK-kben és a JLP-MSKk-ben (P=0.043), illetve az alacsonyabb *Vcam1* szint a JLP-MSKk-ben.



15. ábra: A sejtek közötti kapcsolatok kialakításában részt vevő fehérjék génjeinek kifejeződése az MSC-kben. A *Cd44*, *Coll1a1*, *Ctnnb1*, *Vcam1*, *Eng* és *Mcam* adhéziós molekulákat kódoló mRNS-ek igen nagy mennyiségben detektálhatók az összes vizsgált stroma sejten. Más sejtadhéziós molekulák, mint az *Alcam* és az *Icam1* viszonylag alacsony szinten fejeződnek ki a fiatal állatok csontvelői MSC-iben, viszont jelentős emelkedés volt kimutatható a zsír, az aorta és részben a lép eredetű sejtekben.

Az integrin sejtadhéziós molekulacsalád tagjai - amelyek a sejtek és az extracelluláris mátrix közötti interakciókért felelnek - a 16. ábrán látható módon - változó átíródást mutattak az egyes MSC populációkban. Az integrin α_x (CD11c) (*Itgax*) és az integrin α_v (CD51) (*Itgav*) mRNS szintek hasonlóan mutatkoztak valamennyi stroma sejtvonalban. Az integrin β_1 (CD29) (*Itgb1*) kifejeződése hasonló mértékű a JAo-MSC-kben, a JThy-MSC-kben és a JCsv-MSCk-ben, valamint kissé

magasabbnak bizonyult a Csv-MSCK-ben, a Zs-MSCK-ben és a Jlp-MSCK-ben. A Zs- és a JAo-MSCK-ben kissé, de nem szignifikánsan magasabb integrin $\alpha 6$ (CD49f) (*Itga6*) mRNS kópiaszámot találtunk, mint a többi tenyésztésként nyert sejtekben (16. ábra).



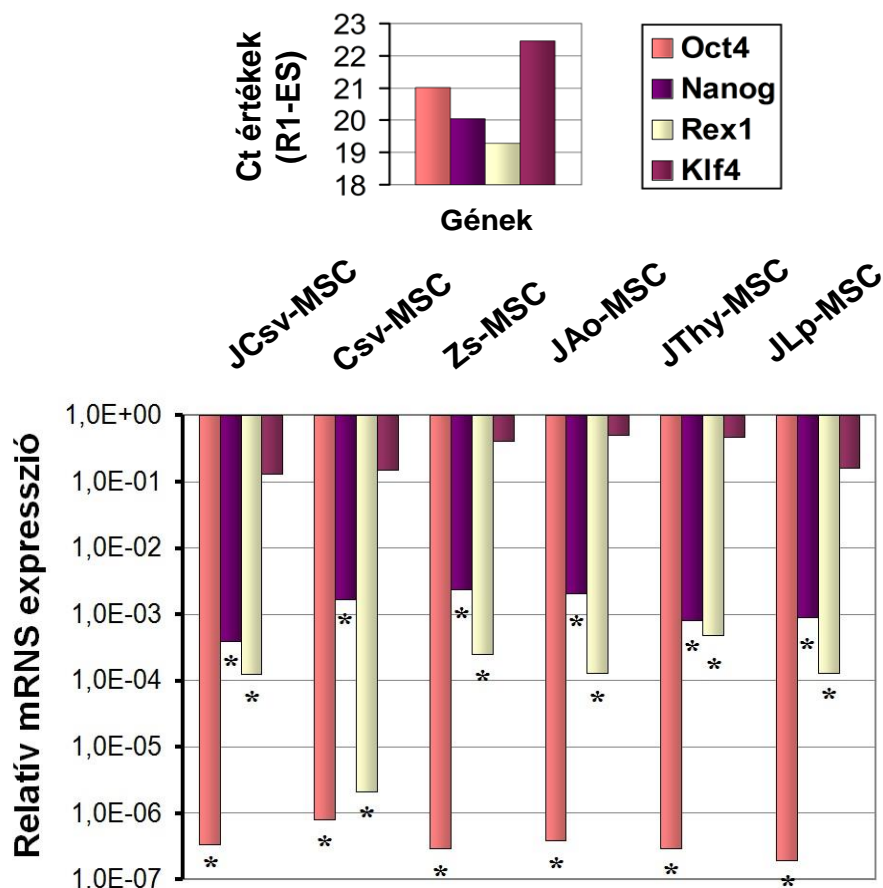
16. ábra: A sejt-extracelluláris mátrix kapcsolat kialakításában szereplő integrin (*Itgb1*), és integrinekhez kapcsolódó molekulák (*Itga6*, *Itgav* és *Itgax*) géneinek kifejeződése az MSC-kben. A vizsgált gének közül az *Itgb1*, az *Itgav* és az *Itgax* gének mRNS-ei hasonló mintázat szerint mutathatók ki a 6-féle MSC mintában. Egyedül az *Itga6* mRNS az, amely jelentős expressziószint emelkedést mutatott a Zs- és JAo-MSCK-ben a JCsv-MSCK-khez képest.

4.5. Az MSC-k nem fejeznek ki pluripotencia géneket

Néhány, nemrégiben megjelent tanulmány szerint a kifejlődött szervezet testi sejtjeinek egy része, így pl. az MSC-k is (Anjos-Afonso és mtsai 2007, Gang és mtsai 2007) kifejezhetnek olyan géneket, amelyeket eredetileg a pluripotens állapottal hozták összefüggésbe. Ezek között szerepelnek a Pou domént tartalmazó *Pou5f1/Oct-4*, a cink-

ujj fehérjék családjába tartozó *Rex-1/Zfp-42* és a *Nanog* transzkripció faktor, melyek az embrionális őssejtek pluripotenciájának fenntartásában is ismert szereppel bírnak.

Hogy utána járjunk ezen feltételezés helyességének, a Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array segítségével megvizsgáltuk ezen faktorok jelenlétét a különböző szervi eredetű MSC kultúrákban. Méréseink egyik MSC sejtvonal esetében sem mutatták ki a fenti pluripotencia markerek átíródását. Eredményeink további igazolásaként egyedi primerek segítségével génenként lefuttatunk néhány kvantitatív RT-PCR reakciót is valamennyi MSC tenyészetre úgy, hogy pozitív kontrollként az eger R1/E embrionális őssejt vonalat használtunk (Gócza Elen szíves felajánlása). Ahogy az a 17. ábrából kitűnik a *Pou5f1/Oct-4* ($P=0.003$), a *Nanog* ($P=0.002$), és a *Rex-1/Zfp-42* ($P=0.003$) mRNS átíratának mennyisége több nagyságrenddel kisebbnek bizonyult – gyakorlatilag nem íródtak át - az MSC-kben, mint az embrionális R1/E sejtekben. A pluripotencia génekkal együtt vizsgált Krüppel-like faktor 4 (*Klf-4*) kifejeződése viszont hasonlóan mutatkozott az MSC-kben és az embrionális őssejtekben (17. ábra). Ez az eredmény azonban nem meglepő számunkra, tekintve a *Klf-4*-nek a fejlődésben, sejtproliferációban és differenciálódásban betöltött sokrétű funkcióját (Evans és Liu 2008). Feltételezzük, hogy ez a gén fontos szereppel bírhat az MSC-k önfenntartásának biztosításában.

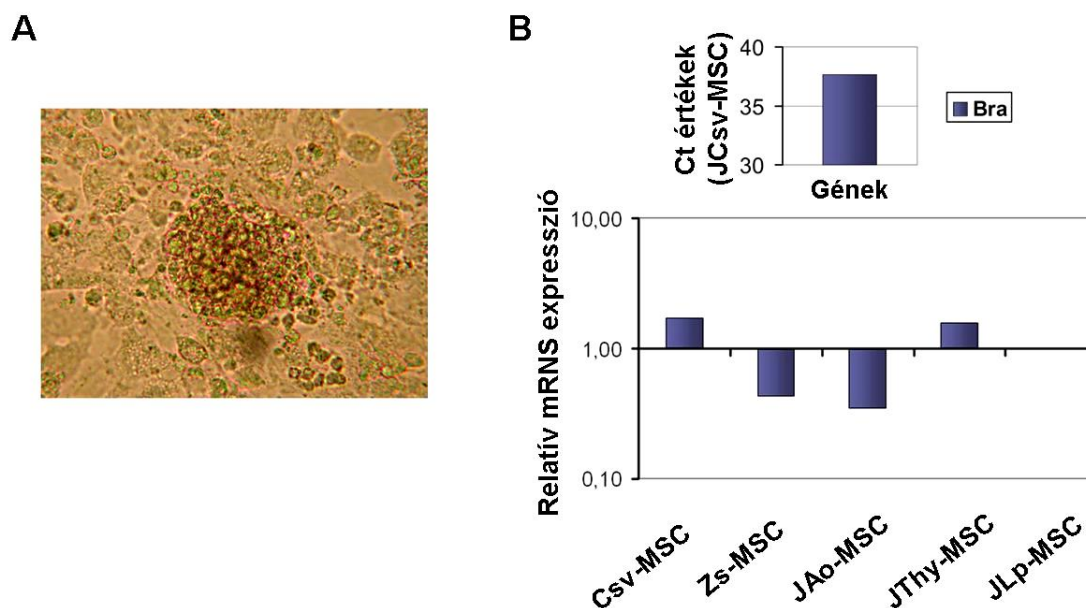


17. ábra: Egyik általunk vizsgált MSC populáció sem tartalmaz pluripotens markereket kifejező sejteket. A qRT-PCR eredmények alapján bizonyítottuk, hogy egy egér embrionális őssejt-vonalhoz (R1/E) képest MSC kultúránk egyike sem fejez ki a pluripotens állapottal összefüggésbe hozható Oct4, Nanog és Rex1 molekulák génjeit. A legnagyobb expressziószint csökkenést az Oct4 mRNS esetében mértük. Továbbá – az R1/E embrionális őssejtekhez hasonlóan – valamennyi MSC kultúrára igen számottevő/meghatározó Klf4 mRNS szint jellemző.

4.6. Az aortából kivont stroma sejtek némileg „kilógnak” a sorból – a különbözőség részletesebb vizsgálata

Az MSC-k szöveti őssejt-mivoltából adódó önmegújító képességét, valamint a belőlük további sejtfejlődési vonalak létrejöttét lehetővé tevő multipotenciával

összefüggésbe hozható gének kifejeződését is meg kívántuk vizsgálni. Az MSC PCR Array eredményei szerint a JAo-MSK-ben igen magas - a másik 5 MSC populációhoz képest 9- és 15-szörös - telomeráz reverz transzkriptáz (*Tert*) és leukémia inhibíciós faktor (*Lif*) mRNS szint mérhető, de valamennyi sejtvonalban mértünk ezekből egy kis mennyiséget (*az eredményeket nem mutatjuk*). A JAo-MSK-k abban is kitűntek a többi kultúra közül, hogy jóval kisebb méretűek és jellegzetes, a többi MSC-től eltérő növekedési morfológiájuk van. Azután, hogy tenyészetük konfluenssé válik, azaz miután benövik a tenyésztőedény alját, rendkívül kompakt, több száz, esetleg több ezer sejtből álló kis csomókban (szferoidokban) növekednek tovább (*18/A ábra*). Ez a fenotípus emlékeztet egy éretlenebb sejtípusra, az ún. „mesoangioblastra”, amely fiatal egér aortájából is könnyen izolálható. A Minasi és mts.-ai (Minasi és mtsai 2002) által bevezetett „mesoangioblast” elnevezés azokat a progenitor sejteket jelöli, melyekből egyaránt létrejöhetnek az erek falát alkotó (vasculáris), valamint azon kívüli (extravasculáris), mesodermális eredetű sejtípusok. A megfigyelések szerint a mesoangioblastok a mesoderma fejlődésének egy jóval korábbi fázisát jelentik, mint a mesenchymalis őssejtek. Ennek következtében képesek még vérképző sejtek létrehozására is (Minasi és mtsai 2002) ez a tulajdonság azonban a mesenchymalis őssejtekre már nem jellemző. Ha nem csak küllemükben, de differenciációs potenciáljukban is megfeleltethetőek ezek a gömbölyded struktúrák a mesoangioblastoknak, akkor feltételezzük, hogy akár vérképző őssejtek is lehetnek az aorta eredetű kultúránk sejtjei között.

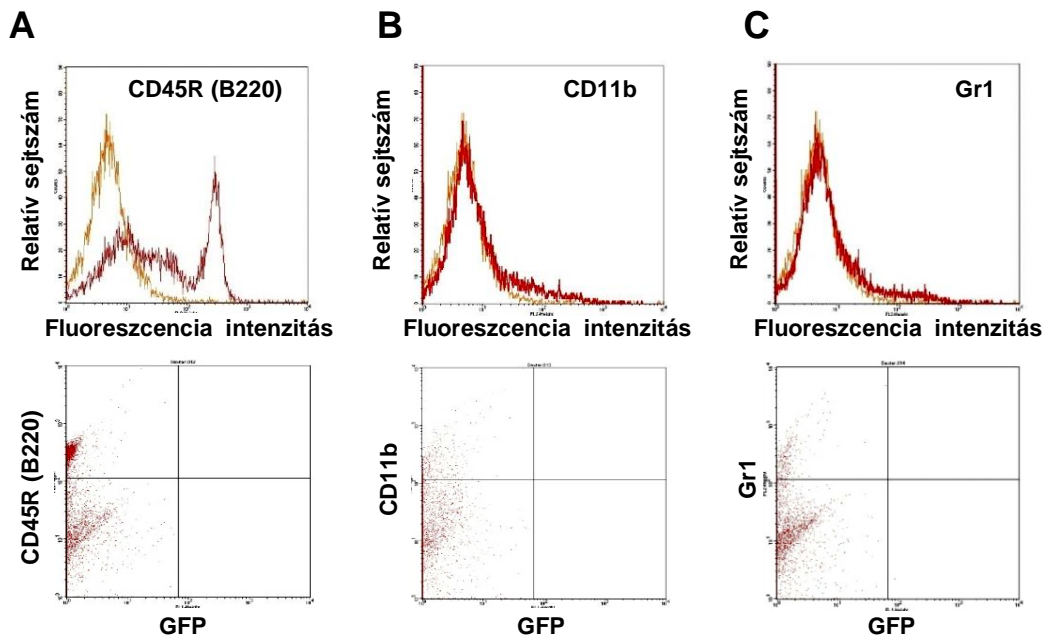


18. ábra: Az aorta eredetű MSC kultúrák növekedési morfológiája (A) emlékeztet, a korai mesodermára jellemző brachyury gén kifejeződése viszont ellene szól a JAo-MSc-k feltételezett mesoangioblast voltának (B). (A) A fáziskontraszt mikroszkópos felvételen látható, hogy a tenyésztőedény alját már-már túlnövő JAo-MSc kultúrákban a sejtek szferoidszerű morfológiát vesznek fel, ami a mesoangioblastokra jellemző tulajdonság (az eredeti nagyítás 40x-es). (B) A Bra (T gén) a korai mesodermára jellemző transzkripciós faktor. Az összes vizsgált stroma kultúrában – beleértve az aorta eredetű sejteket is – a gén alacsony szintű kifejeződése jellemző (Ct=37,7 a JCsv-MSc-ben).

Az aorta-eredetű stroma sejtek valódi kilétét tisztázandó egy sor olyan kísérletet végeztünk el, amelyekben az aorta sejteket vérképző sejtekké próbáltuk differenciáltatni *in vitro* és *in vivo*. Ezen vizsgálatokhoz az aorta eredetű adherens sejteket zöld fluoreszcens fehérje (GFP) génjét hordozó lentivírussal (RRL-PPT.SF91) transzdukáltattuk, majd a zölden világító sejteket FACS berendezés segítségével dúsítottuk. Célunk az volt, hogy a sejteket követni tudjuk az egyes kísérletek során.

I. DEXTER-TÍPUSÚ KOKULTÚRA TESZT

Az aorta falából származó stroma sejteknek vérképzősejt irányú differenciálódási képességét először *in vitro* végzett kísérleteinkben vizsgáltuk. Dexter-típusú kultúrában (Minasi és mtsai, 2002) GFP⁺ aorta eredetű MSC sejteket frissen izolált, még vérképző sejteket is tartalmazó csontvelői sejtekkel inkubáltunk 14 napig 33°C-on. Azt találtuk, hogy a 14. napon vett sejtmintákban egyáltalán nem voltak kimutathatók olyan CD45R pozitív, CD11b pozitív, vagy Gr1 pozitív sejtek, amelyek kettős pozitívok lettek volna, azaz egyidejűleg GFP-t is kifejeztek volna (19. ábra). Vagyis minden, a tenyészetben kimutatható B-sejt (19/A ábra), makrofág (19/B ábra) és granulocita (19/C ábra) GFP negatív volt, azaz a normál csontvelő sejtekből keletkezett, nem pedig az aorta MSC-kből. Minasi és munkacsoportja (Minasi és mtsai 2002) szerint az aorta sejteknek a még vérképző sejteket is tartalmazó csontvelői sejtek jelenlétében vérsejtek irányába kellett volna differenciálódniuk. A különleges kísérleti körülmények (33°C és a tízszeres mennyiségű csontvelő) is – szerintük – ezt lettek volna hivatottak elősegíteni.



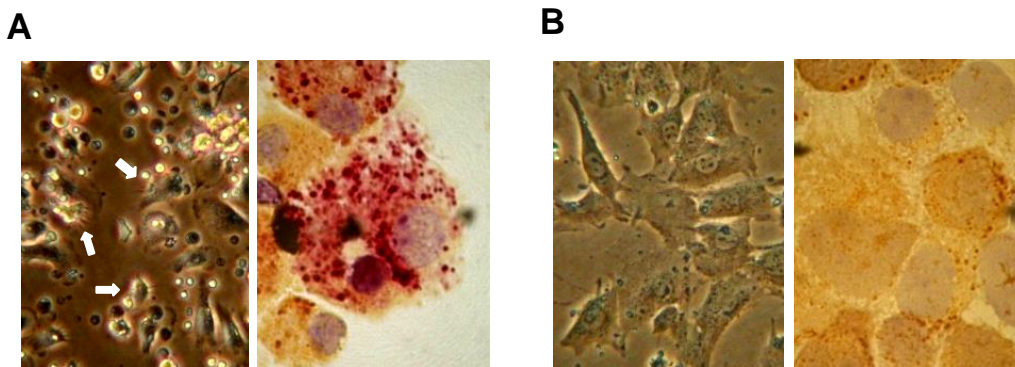
19. ábra: Az aorta eredetű sejtek Dexter kultúrában nem differenciálódnak vérképző sejtekké. Frissen szeparált csontvelői és GFP-vel jelölt aorta sejteket 14

napig együtt tenyésztve Dexter-típusú kultúrában a keletkező CD45R (A), CD11b (B), és Gr1 (C) pozitív sejtek között nem fordulnak elő zölden is fluoreszkáló, azaz kettős pozitív sejtek.

II. OSTEOLAST IRÁNYÚ DIFFERENCIÁLÓDÁS

Az osteoclastok - vagy csontfaló sejtek - a monocytákkal közös előalakkkal rendelkező, hematopoetikus eredetű sejtek. Ezeknek a monocytákhoz hasonló sejteknek a fúziójával jönnek létre az aktív osteoclastok, amelyek a monocyta – makrofág – fagocytá (MPS) rendszer tagjai.

D3 vitamin jelenlétében a csontvelői magvas sejteket – pontosabban az ezek között található osteoclast elődsejteket - *in vitro* osteoclast irányba lehet differenciáltatni. Ezzel a módszerrel is leteszteltük tehát aorta eredetű mesenchymalis stroma sejtjeinket, hogy valóban tartalmazzak-e vérképző eredetű sejteket is? A frissen izolált csontvelőt használtuk kontrollként, amely sejtek tenyésztésében – D3 vitamin hatására - nagy számban keletkeztek tipikus osteoclast morfológiájú, TRAP (tartarát-rezisztens savas-foszfátáz enzim) pozitív sejtek (20/A ábra), míg az aorta eredetű MSC-k kultúráiban osteoclastok nem fordultak elő (20/B ábra).



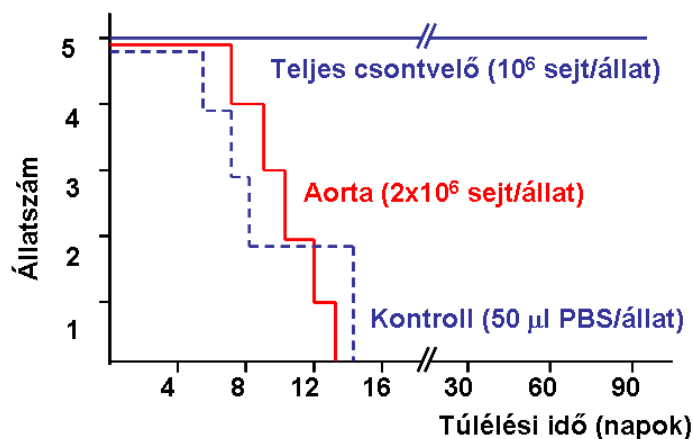
20. ábra: Aorta falából izolált mesenchymalis sejtek D3 vitamin jelenlétében sem differenciálódnak osteoclastokká.

D3 vitamin tartalmú tápfolyadékban a friss csontvelői sejtek (pozitív kontroll) tenyésztésében számos osteoclast keletkezik (A), az aorta eredetű MSC kultúrákban (B) azonban ilyen irányú differenciálódás nem figyelhető meg. A bal oldali képek

fáziskontraszt mikroszkóppal készültek (a fehér nyilak mutatják az osteoclastokat, eredeti nagyítás 20x-os); a jobb oldali képek a TRAP-festés utáni állapotot mutatják (eredeti nagyítás 100x-os).

III. IN VIVO TRANSZPLANTÁCIÓ

A csontvelőhalált okozó, 9 Gy egésztest besugárzásnak kitett szingén (azonos genetikai állományú) egerek hagyományos csontvelő transzplantációval (BMT = bone marrow transplantation) meggyógyíthatók. Ennek során az állatok frissen izolált, vagyis előzőleg nem tenyésztett csontvelői magvas sejteket kapnak, amelyek még vérképző őses elődsejteket is tartalmaznak. Ha friss csontvelő oltvány (graft) helyett aorta eredetű mesenchymalis őssejteket adtunk a besugárzott egereknek, az állatok 6-14 nap alatt elpusztulnak (21. ábra). Az aorta eredetű MSC-k tehát nem képesek helyreállítani a letálisan besugárzott állatok vérképző rendszerét *in vivo*.



21. ábra: Az aorta fali MSC-k nem képesek vérképző sejtekké differenciálódni *in vivo*. Kétmillió aorta sejtet, vagy csak PBS-t (negatív kontroll) adva intravénásan 9 Gy egésztest besugárzásnak kitett egereknek, az állatok 8-14 nap alatt elpusztulnak, míg az egymillió friss magvas csontvelősejttel oltott állatok (pozitív kontroll) életben maradnak.

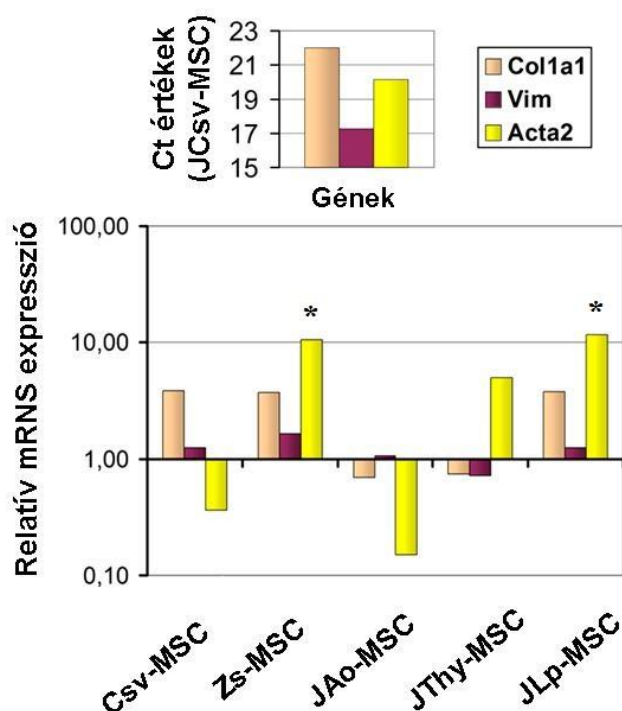
A mesoangioblastokról - vértképző sejtekké történő differenciálódásukon túl - Minasi és munkatársai (Minasi és mtsai 2002) leírták, hogy önmagukban nem, csak fibroblast „tápláló” (feeder) sejtrétegen tarthatók fenn és tenyészthetők. Nekünk azonban minden esetben sikerült „feeder” sejtek nélkül izolálni és növeszteni az aorta eredetű adherens sejteket. Végül pedig lágygél tesztben az aorta eredetű adherens sejtek egyáltalán nem képeztek hematopoetikus kolóniákat (Hegyi és mtsai 2010). Így tehát bizonyossá vált számunkra, hogy a JAo-MSK-k nem képesek hematopoetikus sejtekké differenciálódni sem *in vitro* sem *in vivo*.

A Brachyury transzkripciós faktor (vagy *T gén*) a gasztuláció során a posterior mesoderma specifikációját és differenciálódását szabályozó fehérje (Wardle és Papaioannou 2008). Ezen korai mesoderma marker jelenlétéről kívántunk többet megtudni az általunk vizsgált stroma sejt kultúrákban. A RT-PCR szerint a *T gén* mRNS-ének szintje alig mérhető a JCsv-MSK-kben (küszöbciklus érték: 37,7), ill. a többi sejtvonalból is teljesen hiányzik (*18/B ábra*). Eredményeink arra engednek következtetni, hogy az MSK-k sorsának és szerepének alakításában a Brachyury szerepe elhanyagolható.

4.7. A mesodermális eredetre utaló gének kifejeződése az MSK-kben

A különböző MSK sejtvonalak mesodermális eredetének vizsgálatát a leggyakoribb kötőszöveti fehérjék mRNS szintjének meghatározásával kezdtük el. A simaizom-szövetre jellemző aktin izoforma az α -simaizom aktin (α -SMA) (*Acta2*), az intermedier filamentumok közé tartozó vimentin (*Vim*) és az I-es típusú kollagén javarészen alkotó I. típusú kollagén α -láncának (*Colla1*) jelenlétét PCR Array-vel, valamint kvantitatív RT-PCR-rel határoztuk meg (*22. ábra*). A viszonyítási sejttípusként használt JCsv-MSK-k jelentős mértékben átírják a *Colla1*-t, a *Vim*-t és az *Acta2*-t is (Ct értékek: 21,11; 17,17 és 22,11). Ami a többi MSK vonalat illeti, a JCsv-MSK-khez hasonlóan magas *Colla1* és *Vim* kifejeződést mutattak, ugyanakkor az α -SMA tekintetében jelentős eltéréseket mértünk. Amíg a zsír- és a lép-eredetű MSK-k jóval a JCsv-MSK-k szintje felett (attól 10-szer nagyobb mennyiségben) írták át az *Acta2* mRNS-ét (P=0.024), addig az aorta-eredetű MSK-k ennél kisebb mennyiségben.

Az α -SMA fehérje szintű kimutatása során viszont a JAo-MSc kultúra egységes, minden sejtre kiterjedő kifejeződést mutatott (100%-os pozitivitás). Ezzel szemben a más forrásokból származó MSC-k esetén a sejteknek csak mintegy 40-60%-ában tudtunk α -SMA fehérjét detektálni fehérje szinten, viszont ezekben a sejtekben nagyobb intenzitással volt látható az immunfluoreszcens jelölés (Hegyí és mtsai 2010).

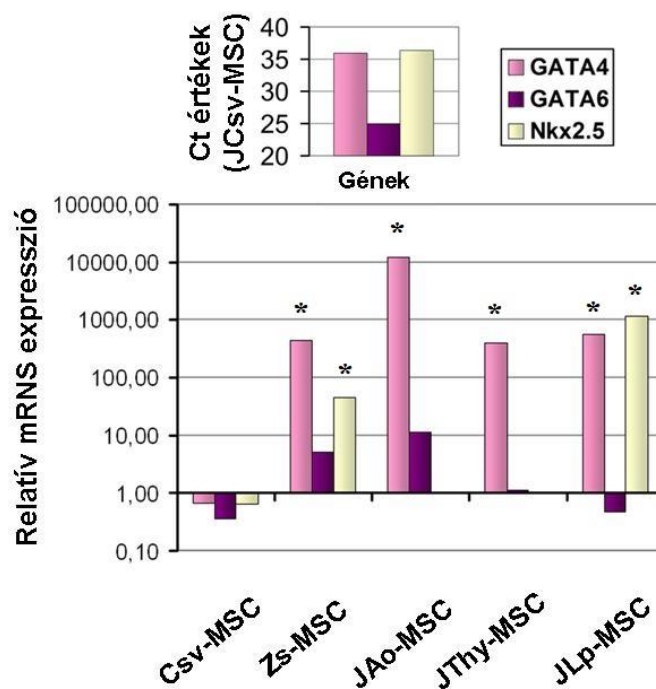


22. ábra: Valamennyi általunk vizsgált MSC kultúrában kifejeződnek a msenchymára jellemző marker gének. A qPCR mérések nagy mennyiségű *Colla1*, *Vim* és *Acta2* mRNS jelenlétét mutatták ki a 6-féle forrásból származó sejtekben. Míg a *Colla1* és a *Vim* hasonló mennyiségben található meg a Csv-, Zs-, JAo-, JThy- és JLP-MSc-kben a JCsv-MSc-khez viszonyítva, addig az *Acta2* mRNS-e körülbelül 10-szeresére nőtt a Zs- és JLP-MSc-kben.

A következőkben három olyan transzkripciós faktort kódoló gén (*Gata4*, *Gata6* és *Nkx2.5*) kifejeződését mértük meg kvantitatív RT-PCR-rel, melyek a mesodermális eredetű sejtek fejlődésében és differenciálódásában játszanak szerepet. Ezek közül a *Gata6* génjének hasonlóan magas kifejeződését mértük valamennyi MSC mintában (23.

ábra). A másik két faktor, a *Gata4* és az *Nkx2.5* mRNS-éből nagyon kevés mutatható ki a JCsv-MSK-kben és a felnőtt egerek Csv-MSK-iben (Ct értékek >35). Sőt, az *Nkx2.5* mRNS szint - a *Gata4*-ével ellentétben - hasonlóan alacsony volt a JAo- és a JThy-MSK-kben. Ezzel szemben a *Gata4* mRNS szintje változó az egyes mintákban, a ~800-szoros és a körülölbélül tízezerszeres mennyiség között volt mérhető a Zs-, JThy- JLp- és a JAo-MSK-kben (P=0.011) a JCsv-MSK-khez viszonyítva. Az *Nkx2.5* magas kifejeződését találtuk a Zs-MSK-kben és a JLp-MSK-kben, ez ~80-, illetve ~1000-szerese a JCsv-MSK-kben mértnek (P=0.049).

A fent kapott eredmények arra utalnak, hogy a különböző MSC populációkat mesodermális eredetű mesenchymális sejteknek tekinthetjük.

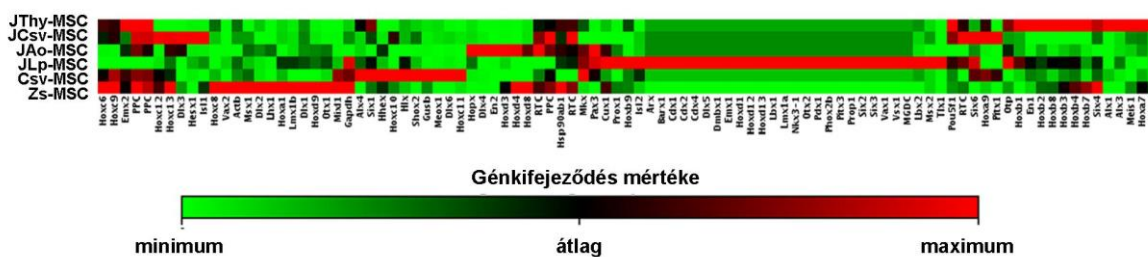


23. ábra: Mesodermális marker gének kifejeződése az MSC-kben. Egyedi primerekkel végzett RT-PCR méréseink egységesen magas *Gata6* mRNS szintet mutattak valamennyi MSC mintában. Ugyanakkor a *Gata4* és *Nkx2.5* átíratok igen alacsony mennyiségben voltak kimutathatók a JCsv-MSK-kben, míg ehhez képest a *Gata4* a Zs-, JAo-, JThy- és JLp-MSK-kben, valamint az *Nkx2.5* a Zs- és a JLp-MSK-kben nőtt jelentősen.

4.8. Az MSC-k pozicionális memóriája

A homeotikus szelektor (Hox) gének egy - evolúciós értelemben - konzervált transzkripciós faktor családot kódolnak. Ezek a szabályzó molekulák az embrió testének elsődleges (anterior-posterior) és másodlagos (dorso-ventrális) testtengely mentén történő felosztásáért felelnek. Kifejeződésük, illetve a különböző Hox gének kifejeződésének kombinációja meghatározza, hogy adott pozícióban milyen struktúrák fejlődjenek. A kifejlett állatban is megőrzött expressziós mintázatuk pedig, mint egyfajta pozicionális memória jelzik, hogy az adott sejt melyik anatómiai helyről származik (Wang és mtsai 2009).

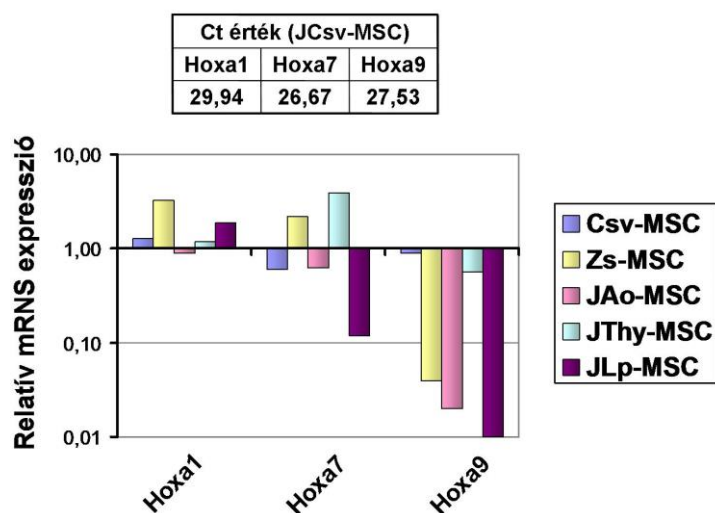
Annak eldöntésére, hogy a Hox gének vajon szerepet játszanak-e az eltérő eredetű stroma sejtek közötti szövetspecifikus különbségek kialakításában, mindegyik MSC mintában megvizsgáltuk a Hox génkifejeződési mintázatot. Ezen kísérletek során elsősorban a *Mouse Homeobox (HOX) Genes PCR Array* használatára támaszkodtunk, amely összesen 84 Hox-specifikus primer párral dolgozik (24. ábra). Az eredeti Ct értékeket a 2. kiegészítő táblázat tartalmazza.



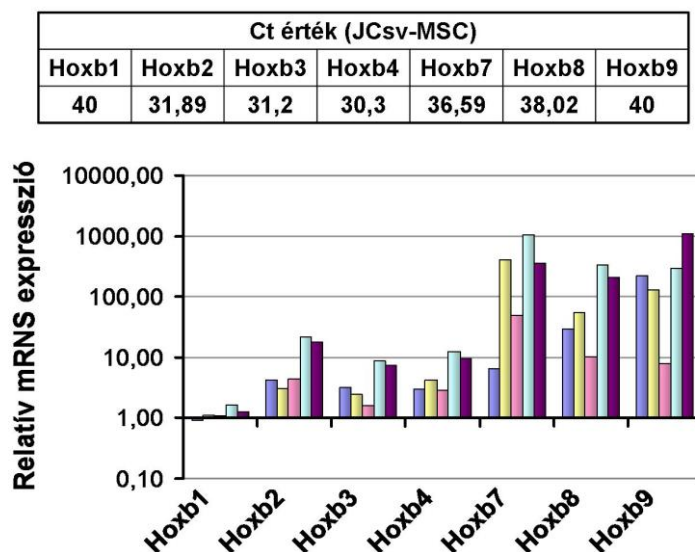
24. ábra: A *Mouse Homeobox (HOX) Genes PCR Array*-vel végzett mérések eredményéből létrehozott hőterkép 84 gén relatív kifejeződését ábrázolja. Minden egyes oszlop egy adott gén relatív expressziós szintjét jelöli a különböző szövetekből származó MSC mintákban. A piros szín a normalizáláshoz használt housekeeping génhez – jelen esetben a *Hprt1*-hez - viszonyított nagyobb mennyiségű mRNS szintet jelöli, míg a zöld szín az ehhez képesti csökkent kifejeződést mutatja. A vízszintes sorokban az eltérő szöveti forrásból származó MSC-k találhatók, és bennük a 84 vizsgált gén kifejeződési mintázata olvasható le.

A 4 klasszikus Hox gén család (Hox a, b, c, d) számos génje közül 24-nek a jelenlétét hasonlítottuk össze a különböző stroma sejt kultúrákban. A PCR vizsgálat azt az eredményt hozta, hogy a 24-ből 5 gén (*Hoxa1,7, Hoxb3,4 és Hoxd9*) az összes MSC sejtvonalon igen nagy mennyiségben íródott át. További 6 gén (*Hoxb1,9, Hoxd1,3,12,13*) egyik sejtpopulációban sem volt megtalálható, a maradék 13 gén (*Hoxa9, Hoxb2,7,8, Hoxc6,8,9,10,11,12,13 és Hoxd4,8*) pedig eltérő kifejeződési mintázatot mutatott a különböző forrásból származó tenyészetekben (25. ábra). Elmondhatjuk tehát, hogy az MSC-k egyedi “Hox kóddal”, vagy más szóval “Hox gén kifejeződési ujjlenyomattal” jellemezhetők, és ez a speciális génmintázat utal az adott sejtpopuláció eredeti anatómiai elhelyezkedésére.

A

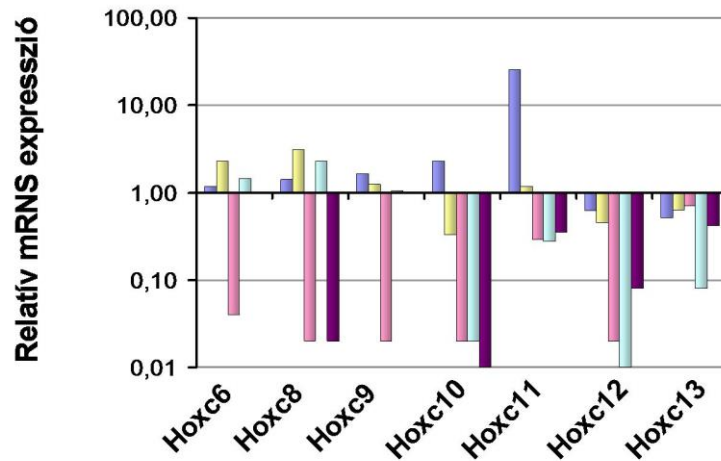


B



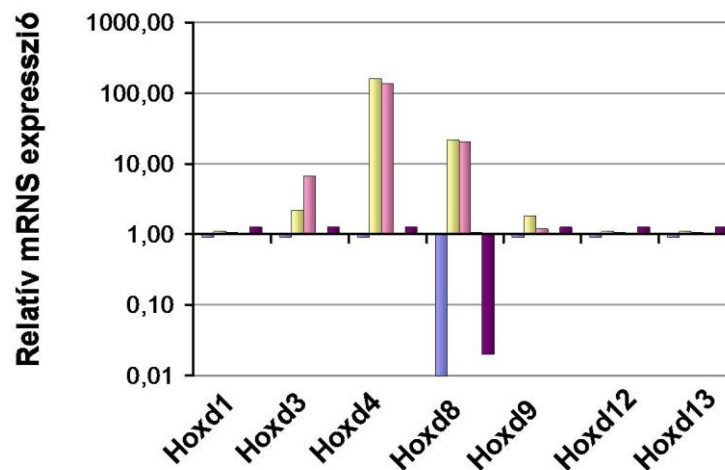
C

Ct érték (JCsv-MSK)						
Hoxc6	Hoxc8	Hoxc9	Hoxc10	Hoxc11	Hoxc12	Hoxc13
24,62	28,93	26,78	27,94	33,27	27,4	25,57



D

Ct érték (JCsv-MSK)						
Hoxd1	Hoxd3	Hoxd4	Hoxd8	Hoxd9	Hoxd12	Hoxd13
40	40	36,82	28,61	38,29	40	40



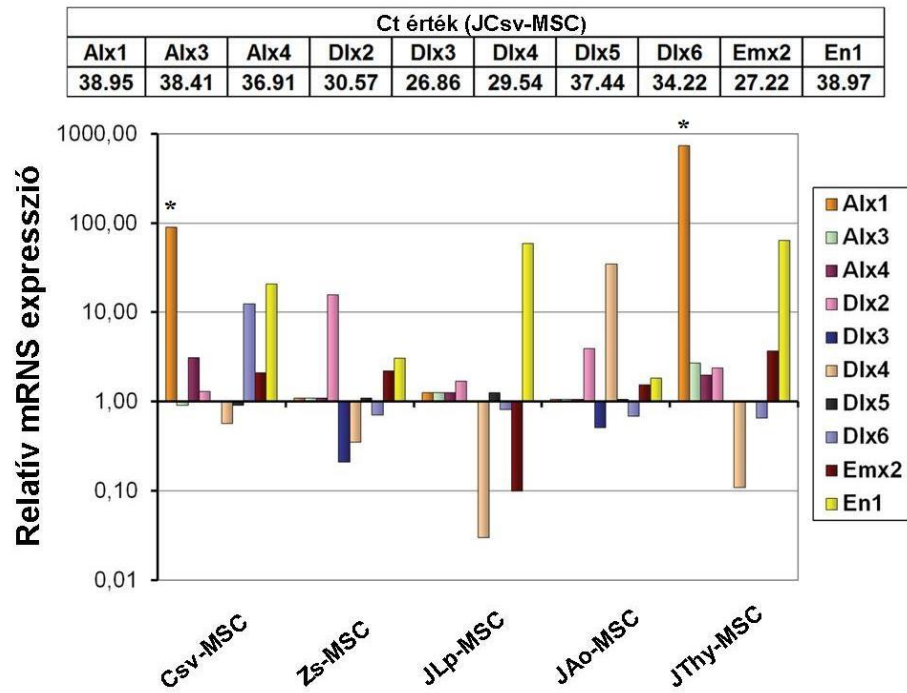
25. ábra: A különböző szervekből izolált adherens sejtek eltérő Hox gén kifejeződési mintázattal rendelkeznek. A *Mouse Homeobox (HOX) Genes PCR Array* tartalmazza a 4 klasszikus Hox család számos génjét: (A) *Hoxa1,7,9*; (B) *Hoxb1,2,3,4,7,8,9*; (C) *Hoxc6, 8,9,10,11,12,13*; (D) *Hoxd1,3,4,8,9,12,13*. Ezek közül néhány határozottan magas kifejeződést mutat valamennyi MSC kultúrában

(*Hoxa1,7; Hoxb3,4; és Hoxd9*). Továbbá, vannak olyan klasszikus Hox gének, amelyek teljesen hiányoznak az összes MSC mintából (*Hoxb1,9, és Hoxd1,3,12,13*). A maradék 13 gén pedig eltérő mennyiségben van jelen a különböző helyekről származó sejtekben (*Hoxa9; Hoxb2,7,8; Hoxc6,8,9,10,11,12,13 és Hoxd4,8*). Az adatok 3 független mérés átlagából származnak.

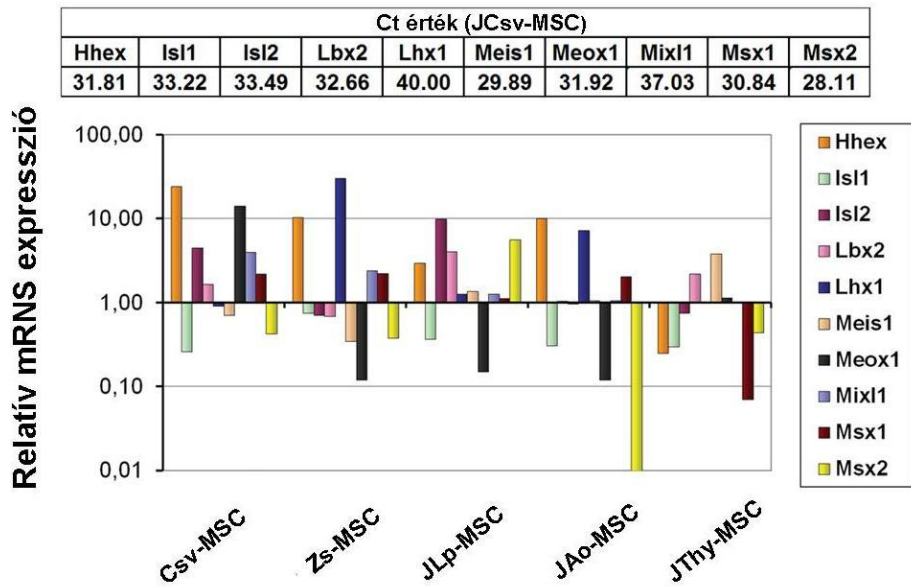
21 egyéb - funkcióját tekintve részben leírt, de főként ismeretlen - homeodomén-tartalmú transzkripciós faktort kódoló gén átíródását is vizsgáltuk a sejt kultúrákban. Ezek egyikét sem tudtuk kimutatni egyik MSC vonalban sem (*adatokat nem mutatjuk*). Ezek a gének a következők: *Arx, Barx1, Cdx1,2,4, Dmbx1, Emx1, Hopx, Lbx1, Lmx1a,1b, Nkx3-1, Otx2, Pdx1, Phox2b, Pitx3, Prop1, Six3, Vax1, Vsx1*.

Ugyanakkor, 30 másik - a testtájak kialakításában, a morfogenezisben és más egyedfejlődési folyamatokban részt vevő - homeobox-tartalmú gén, noha eltérő mértékben, de megtalálható a különböző eredetű MSC sejt vonalainkban. Ezek az általunk vizsgált, ún. nem klasszikus Hox gének a következők: *Alx1,3,4, Dlx2,3,4,5,6, Emx2, En1 (26/A ábra), Hhex, Isl1, Isl2, Lbx2, Lhx1, Meis1, Meox1, Mixl1, Msx1,2 (26/B ábra), Otp, Otx1, Pax3, Pitx2, Prox1, Shox2, Six1,2,6*, és a *Vax2 (26/C ábra)*. Az *Alx1* gén kifejeződése például - amely az agy, az arc koponya csontok és a végtagok, elsősorban a porcsejtek fejlődésében játszik szerepet (Beverdam és Meijlink 2001) - igen eltérő az egyes tenyészetekben. A Csv-MSC-kben mintegy százszoros ($P=0.014$), a JThy-MSC-kben pedig körülbelül ezerszeres ($P=0.003$) mRNS szinteket mértünk a JCsv-MSC-khez viszonyítva (*26/A ábra*). Másik példa a *Pax3*, amely fontos szerepet játszik a dúlcécből kialakuló sejtek fejlődésében, de a somiták területén is kimutatható (Buckingham és Relaix 2007, Langha és mtsai 2009). Mennyisége a Csv-, a JAo-, valamint a JLp-MSC-kben több mint százszorosa ($P=0.006$) a JCsv-MSC-kben mérhetőnek.

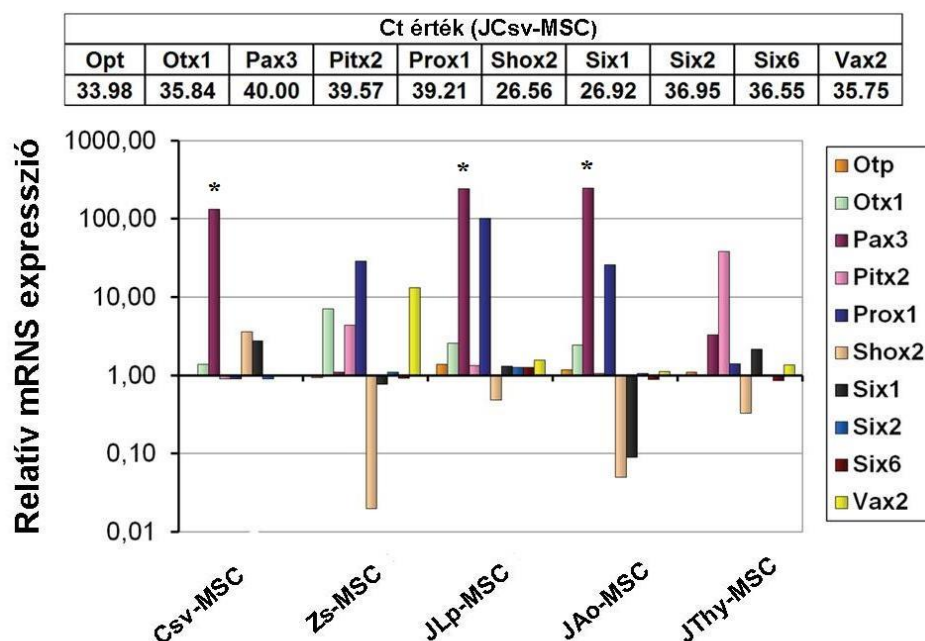
A



B

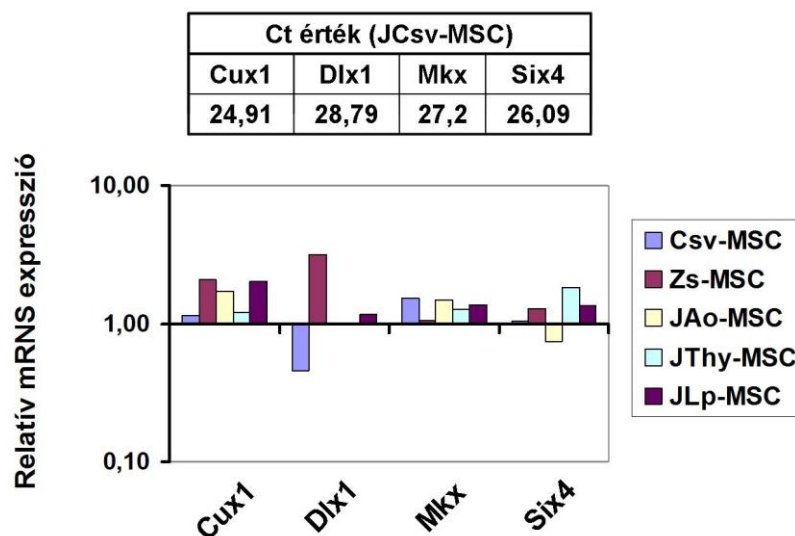


C

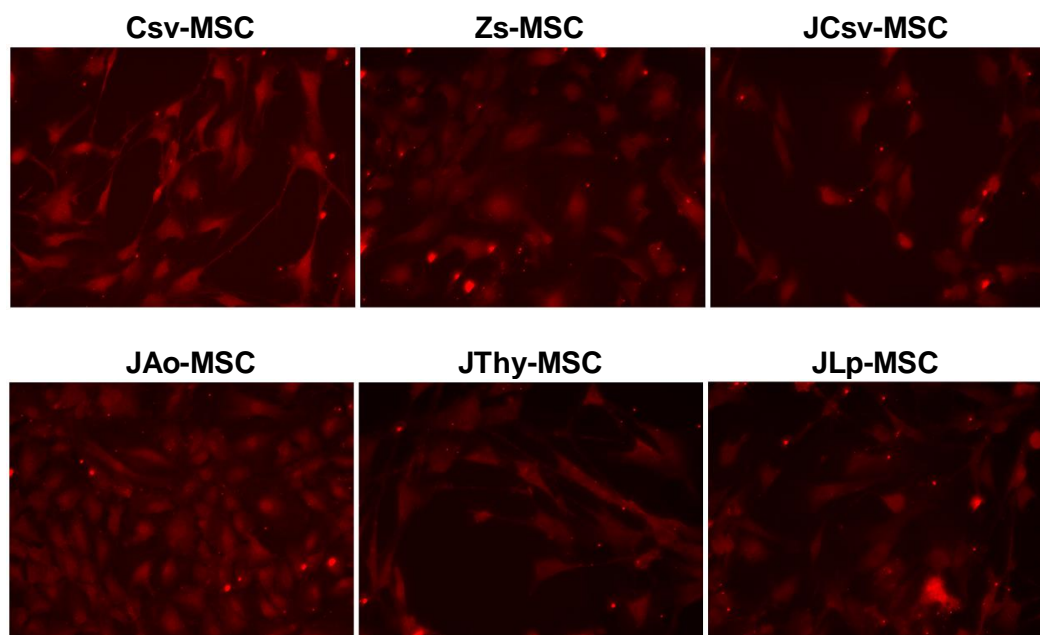


26. ábra: Nem klasszikus Hox-gének kifejeződése az MSC-kben.

Találtunk továbbá olyan, homeodomén-tartalmú transzkripciós faktorokat kódoló géneket – mint amilyen a cut-like homeobox 1 (*Cux1*), a distal-less homeobox 1 (*Dlx1*), a Mohawk (*Mkx*), és a sine oculis-related homeobox 4 (*Six4*) – amelyek egyaránt magas kifejeződést mutattak valamennyi sejtvonalunkban. Irodalmi adatok alapján tudjuk, hogy a *Cux1* fontos szerepet játszik a sejtváz átépülésében, a sejtek közötti adhézióban, a sejteknek az extracelluláris mátrixhoz való kapcsolásában, az epiteliális-mesenchymális tranzícióban, valamint transzkripció szabályozásban (*Sansregret és Nepveu 2008*). A *Dlx1* nélkülözhetetlen bizonyos előagyi neuronok differenciációjában, és az arckoponya struktúráinak (csontok, izmok) mintázatának kialakításában („patterning”), valamint fontos szereppel bír a tengely- és végtagvázak fejlődésében is (*Kraus és Lufkin 2006*). Az *Mkx* minden, somita eredetű sejtvonalban kifejeződik (*Anderson és mtsai 2006, Ito és mtsai 2010*), hasonlóan a *Six4* génhez, mely a somiták és a végtagbimbók területén is expresszálódik (*Kumar 2009*) (27. ábra). A Mohawk gén kifejeződését fehérje szinten is megerősítettük immunfluoreszcens mérés segítségével (28. ábra).



27. ábra: Az összes MSC mintában egységesen magas kifejeződést mutat a *Cux1*, *Dlx1*, *Mkx* és *Six4* homeobox régióval rendelkező gén mRNS-e.

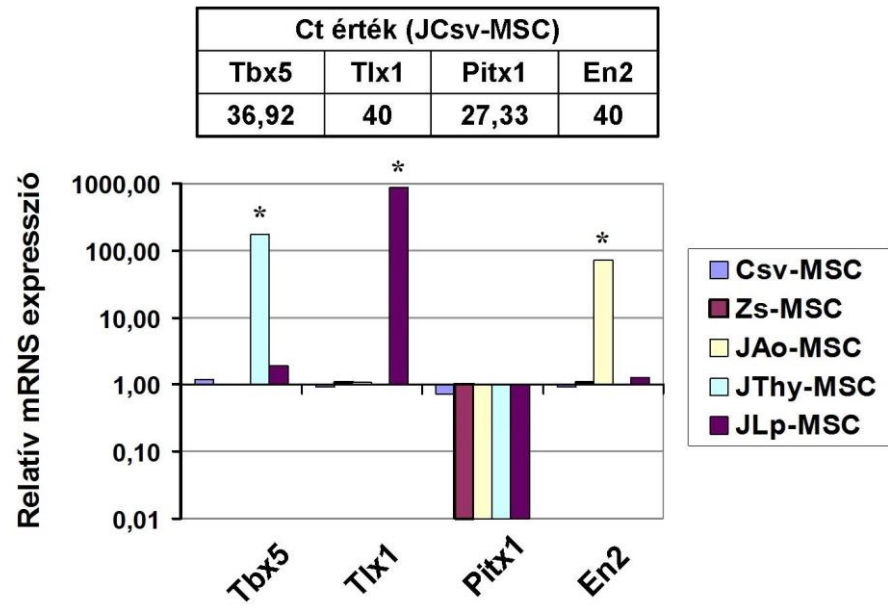


28. ábra: A Mohawk (*Mkx*) transzkripciós faktor immunhisztokémiai kimutatása.

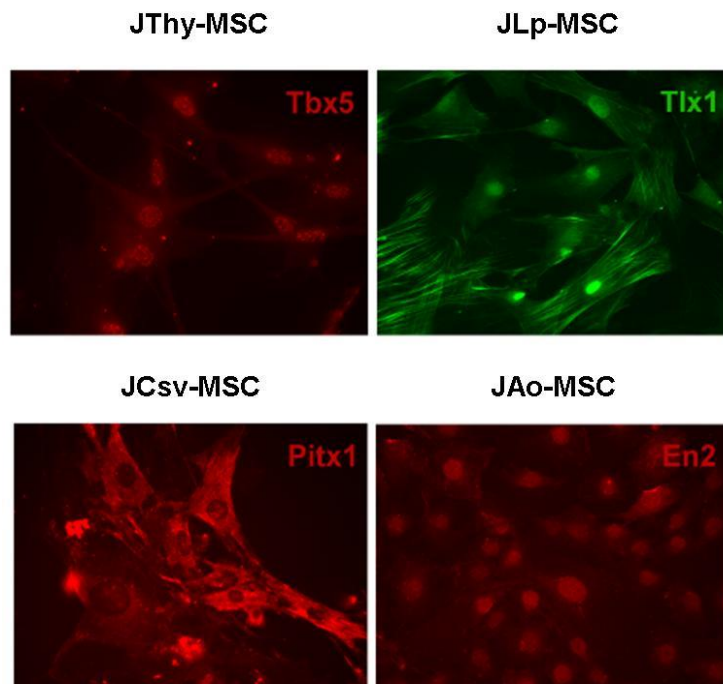
Az *Mkx* fehérje immunfluoreszcens jelölődése a csontvelői, zsír, juvenilis csontvelői, aorta fali, thymus és lép eredetű MSC-kben. Az elsődleges ellenanyag kecskében termeltetett poliklonális anti-*Mkx*, a másodlagos antitest NL-557 fluorokrómval konjugált számrban termeltetett anti-kecske IgG volt. Az elsődleges antitest nélküli jelölés szolgál negatív kontrollként.

Még érdekesebb, hogy sikerült olyan transzkripciós faktorokat azonosítanunk, amelyek csak egy adott MSC populációban fejeződtek ki jelentős mértékben, míg a többiben teljesen hiányoztak. A T-box 5 (*Tbx5*) például, amely a felső végtagok és a szív fejlődésében játszik szerepet (Wardle és Papaioannou 2008, Chapman és mtsai 1996), különösen nagy mennyiségben íródott át a JThy-MSC-kben ($P=0.037$). Az engrailed homeobox 2 (*En2*) a JAo-MSC-kben ($P=0.028$) volt szembetűnő, a T-sejt leukémia homeobox 1 (*Tlx1*) pedig a JLP-MSC-ben ($P=0.017$). Ez utóbbi transzkripciós faktor alapvető szereppel bír a lép korai szervtelepének mintázatkialakításában és a lépsejtek proliferációjában (Kanzler és Dear 2001, Brendolan és mtsai 2007). A paired-like homeodomén transzkripciós faktor 1 (*Pitx1*) – mely a hátsó végtagok fejlődésében működik közre (Meijlink és mtsai 1999) - kifejeződése a combcsontból nyert csontvelő eredetű sejtekben (JCsv-MSC-k és Csv-MSC-k) volt jellemző ($P=0.024$) (29/A ábra). Specifikus antitestekkel végzett immunfluoreszcens méréssel sikerült fehérje szinten is megerősítenünk a *Tbx5*, az *En2*, a *Tlx1*, és a *Pitx1* kifejeződést az adott MSC mintákban (29/B ábra). Továbbá Western blot technika segítségével megmutattuk azt is, hogy a *Tbx5* fehérje csak a thymus eredetű sejtekben van jelen, viszont hiányzik a fiatal csontvelő eredetű MSC-kből (29/C ábra). A fehérjék szintjén is elvégzett mérések tehát megerősítették azt, amit már mRNS szinten is láttunk, vagyis, hogy az adott anatómiai eredethez megfelelő géntermék kifejeződés társul az egyes sejtpopulációkban. Így például a *Tbx5* kifejeződése a JThy-MSC-kben, a *Tlx1*-é a JLP-MSC-kben, a *Pitx1*-é a JCsv-MSC-kben és a Csv-MSC-kben, illetve az *En2* jelenléte a JAo-MSC-kben jellemző.

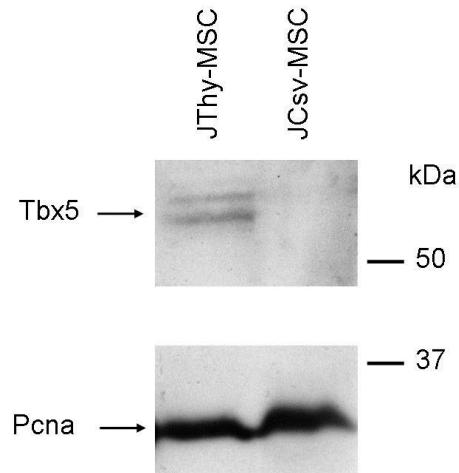
A



B



C



29. ábra: Az egyes MSC kultúrákban preferenciális kifejeződést mutató gének.

(A) A csak az egyes MSC populációkban kifejeződő gének közül a *Tbx5* a thymus, a *Tlx1* a lép, a *Pitx1* a csontvelő, míg az *En2* az aorta fal eredetű sejtekben mutatható ki. (B) Speciális antitestek segítségével immunfluoreszcens jelöléssel sikerült megerősítenünk a PCR-rel kapott mRNS szintű eredményeket. (C) Hasonló szinten, a *Tbx5* esetén Western blot technikával ugyanezt az eredményt kaptuk.

Eredményeink azt jelzik, hogy a különböző szöveti és szervi eredetű MSC sejtvonalak jól elhatárolhatóak egymástól génkifejeződési mintázatunk alapján is, mert a mesodermális fejlődésnek és az elhelyezkedésüknek megfelelő anatómiai régióknak más és más, jellegzetes génjeit fejezik ki.

5. Megbeszélés

5.1. A különböző szöveti eredetű adherens sejtek karakterizálása

A szakirodalomban egyre nő az olyan közleményeknek a száma, amelyekben a különböző egér (da Silva Meirelles L és mtsai 2006) vagy emberi (Beltrami és mtsai 2007, Covas és mtsai 2008) szövetekből, illetve szervekből származó MSC-k vagy MSC-szerű sejtek vizsgálatával foglalkoznak. Intenzív vita folyik arról, hogy hogyan lehet az MSC-ket biztosan megkülönböztetni a hozzájuk igen hasonló tulajdonságokkal rendelkező szöveti fibroblastoktól, myofibroblastoktól vagy az érfalakban perivascularisan elhelyezkedő sejtektől. Egyre többen vannak azon az állásponton, hogy azon sejtpopulációk, amelyek plasztik adherensek, bizonyos sejtfelszíni molekula mintázattal rendelkeznek, valamint képesek differenciálódni zsír, porc és csont irányba, nevezhetők MSC-knek (Bianco és mtsai 2008, Haniffa és mtsai 2009). Ennek megfelelően fontosnak tartottuk megvizsgálni, hogy 14 napos és 10-12 hetes C57Bl/6 egérből izolált és kultúrában tenyésztett MSC-k megjelenésükben, illetve funkcionálisan megfelelnek-e az MSC-kkel szemben 2006-ban az ISCT által bevezetett kritériumoknak (Dominici és mtsai 2006), illetve azon túl is mennyire hasonlítanak-e egymáshoz? Eredményeink azt mutatják, hogy az általunk izolált valamennyi stroma sejtvonal többé-kevésbé megfelelt az MSC-kkel szemben támasztott követelményeknek. A sejtkultúrák morfológiai megjelenése igen hasonló volt, ennek ellenére számos különbséget is megfigyeltünk bennük, elsősorban a sejtfelszíni molekula mintázatban, valamint a differenciálódási képességben. Ezen eltérések okának további, de már mRNS szintű vizsgálatok segítségével jártunk utána.

5.2. A különböző szöveti eredetű adherens sejtek génkifejeződési jellegzetességeik összehasonlítása

Az MSC-k biológiájával kapcsolatos kérdések között egy újra meg újra visszatérő, eddig még megválaszolatlanul maradt kérdés az, hogy vajon mikor dől el a sejtek sorsa, vagyis az ontogenezis mely szakaszában történik meg a szöveti elköteleződésük. Nem világos, hogy ez már a korai embriogenezisben megtörténik-e,

tehát még a szövetek kialakulása előtt kijelölődik-e a későbbi hovatarozásuk, vagy csak később az adott szöveti környezet, amelybe kerültek, lehet a meghatározó ebből a szempontból. E kérdés megválaszolásában ez idáig is az jelentette a legnagyobb akadályt, hogy nem ismerünk olyan, csak az MSC-kre jellemző markert, amely lehetővé tenné ezeknek a sejteknek a kizárólagos követését. A klasszikus „lineage tracing” módszer így esetükben nem alkalmazható, ehelyett a különböző szövetekből kinyert MSC-k jellemzésére olyan gén együttesek átíródását vizsgáltunk meg, amelyeket 4 különböző csoportra oszthatunk. Ezek a gén együttesek jó eséllyel jellemezhetik az MSC-eket, ugyanis 1.) pluripotenciával összefüggésbe hozható gének, 2.) többször leírt, ún. klasszikus MSC gének, 3.) mesenchymális és mesodermális sejtekre jellemző gének és 4.) a mesoderma szegmentációjában, ill. a somiták fejlődésében szerepet játszó gének szerepelnek közöttük.

Nemrégiben olyan publikációk láttak napvilágot, melyekben mind rágcsló (Anjos-Afonso és Bonnet 2007), mind emberi eredetű (Gang és mtsai 2007) stroma sejt kultúrák kicsiny alpopulációiban pluripotenciával összefüggésbe hozható gének - elsősorban a *Pou5f1/Oct-4* - kifejeződését írták le. Ezeket az “embrionális jellegűnek” titulált őssejteket tették a szerzők felelőssé a vázrendszer szöveteinek felnőttkori megújulásáért, vagy a sérülést követő regenerációjáért. Ezzel szemben Lengner és mts.-ai (Lengner és mtsai 2007) kizárták egy pluripotens szubpopuláció jelenlétét az MSC kultúrákban és nem tudtak kimutatni pluripotenciával összefüggésbe hozható génkifejeződést sem. Eredményeink ez utóbbi közlemény igazát támasztják alá, ugyanis egyik szöveti eredetű MSC tenyészetben sem találtunk *Pou5f1/Oct-4*, *Nanog*, és *Rex-1/Zfp-42* mRNS-t. E faktorok expresszióját ES sejtekben sikerrel kimutattuk és ez utóbbi eredményeket használtuk összehasonlítási alapként az MSC-kben történő átíródás hiányának szemléltetéséhez. Eredményeink szerint tehát nincsenek “embrionális maradványnak” tekinthető, vagyis embrió-eredetű pluripotens sejtek a megszületés után kinyerhető MSC sejtpopulációkban. Így nem nyert bizonyítást az a nézet, miszerint az MSC-k önfenntartó képességének és a szöveti homeosztázis fenntartásában betöltött szerepének háttérében egyes pluripotencia gének megőrzött kifejeződése állna.

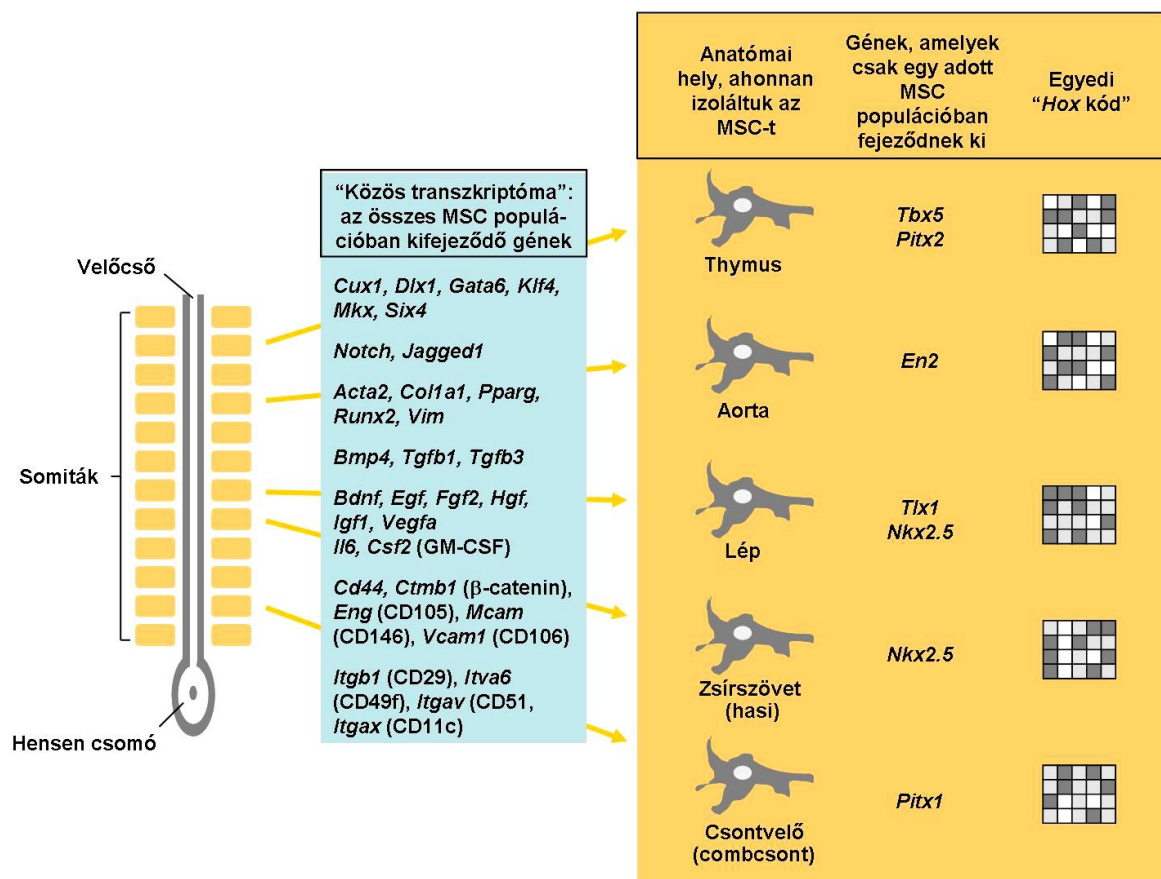
Korábban megjelent tanulmányainkban (Hegyí és mtsai 2010, Urbán és mtsai 2008) és jelen munkában (Sági és mtsai 2012) egér különböző szöveteiből, szerveiből

izolált MSC-ket hasonlítottunk össze a rájuk jellemzőnek elfogadott, klasszikus MSC markerek és differenciációs faktorok (Bglap1, Runx2 és Pparg) átíródása, ill. a sejtek plaszticitása szempontjából. Utóbbi vizsgálathoz a tenyésztési körülmények módosításával a sejteket adipocytá és osteoblast irányokba differenciáltattuk. Ahogy várható volt, valamennyi sejt kultúrában kimutattuk a jellegzetes MSC sejt felszíni markereket. A különböző szöveti eredetű kultúrák között a felszíni markerek megjelenésében mennyiségi eltéréseket ugyan kimutattunk, de minőségi különbségeket nem tapasztalunk. Fehérje szintű adataink jól egybevágtak a PCR-rel kapott eredményekkel és a sejtek differenciációs képességével.

5.3. A különböző szöveti eredetű adherens sejtek leszármazása: az egyedfejlődés történései és az izolálás forrásául szolgáló szöveti környezet pozicionális memóriája a génkifejeződés jellegzetességeiben

Menicanin és munkatársai (Menicanin és mtsai 2009) az MSC-k egységes mesodermális eredetét feltételezik. A mi eredményeink is ezt támasztják alá, hiszen sikerült behatárolnunk és leírni egy olyan „közös transzkriptómát”, mely valamennyi MSC sejt vonalra jellemző, bármely általunk vizsgált szövetből származék is (29. ábra). Eszerint minden egyes MSC mintában nagy mennyiségben íródtak át tipikus mesenchymális és mesodermális markerek (α -simaizom aktin, I-es típusú kollagén α -lánc, PPAR γ , Runx2, vimentin), növekedési faktorok (BDNF, EGF, FGF2, HGF, IGF1, VEGF α), morfogének (BMP4, TGF- β 1, TGF- β 3), citokinek (IL-6, GM-CSF), sejtadhéziós molekulák (CD44, β -katenin, endoglin, MCAM, VCAM1) és integrinek (CD29, CD49f, CD51, CD11c) génjei. Néhány szekretált, ill. sejt felszínre kikerülő fehérje molekula - mint amilyen a BMP6, az FGF10 és a HGF - génjének tekintetében találtunk ugyan jellegzetes mennyiségi eltéréseket, típusaik azonban ugyanazok voltak az egyes MSC sejt vonalakban (minőségi eltérés nem volt közöttük). Ami talán a legfontosabb sajátossága ennek a közös expressziós mintázatnak, az az, hogy számos olyan transzkripciós faktor is benne foglaltatik, melyeknek alapvető biológiai folyamatokban tulajdonítanak jelentőséget. Ilyen például a *Cux1*, *Klf4* és a *Gata6*, melyeknek az embrionális fejlődés, a szervfejlődés, a sejtprolifерáció és differenciálódás során ismert szereppel bírnak (Sansregret és Nepveu 2008, Suzuki és mtsai 1996).

Kimutatták például, hogy emberi MSC-k önmegújító képessége lecsökken, ha a *GATA6*-ot kis gátló RNS-sel kiütötték bennük (Kubo és mtsai 2009). A *Gata4* transzkripciós faktor génje - a csontvelő eredetűek kivételével - valamennyi MSC sejtvonalban kifejeződött. A *Gata4* kifejeződését olyan jelátviteli utak szabályozzák, melyek az endoderma és a mesoderma korai meghatározódása során, azaz a zsigeri szervek egy részének (szív, belek, máj, hasnyálmirigy, simaizmok) kialakulása idején lépnek működésbe és irányítják azokat (Watt és mtsai 2007). Egy másik transzkripciós faktor génje, az *Nkx2.5* a JAo-MSK-kben és a JLP-MSK-kben mutatott magasabb expressziót, és ugyanitt fokozta a *Gata4* átíródását is (Riazi és mtsai 2009). Érdekes, hogy a *Pax3* gén egyaránt kifejeződött a csontvelő, a lép és az aortafal eredetű sejtekben is. Morikawa és mts.-ai (Morikawa és mtsai 2009) azt állítják, hogy a posztnatális MSK-k a dúclécből eredeztethetőek. Miután a *Pax3* kifejeződik a dúclécben, valamint szerepet játszik a dúclécből származó sejtek további fejlődésében is, nem zárhatjuk ki annak a lehetőségét, hogy az MSK-k egy kisebb alpopulációja valóban a dúcléc sejtek leszármazottja. Ugyanakkor a *Pax3* kifejeződés egyes somita területekre is jellemző, mégpedig azokra, melyekből a későbbiekben az embrionális vázizmot alkotó progenitorok, illetve a fejlődő végtagbimbók vázizmát létrehozó progenitorok jönnek létre (Lagha és mtsai 2010). Továbbá az általunk vizsgált olyan gének átíródását, melyek az agy és általánosan az idegrendszer fejlődésében játszanak szerepet – így az *Arx*, az *Dmbx1*, az *Lbx1*, az *Otx2*, a *Phox2b*, a *Prop1*, és a *Six3* – az MSK sejtvonalak egyikében sem tudtuk kimutatni. A különböző MSK populációk génkifejeződési profiljában megmutatkozó nagyfokú hasonlóság arra enged következtetni, hogy a különböző szövetekből izolált adherens stroma sejtek fenotípusukat tekintve rokon jellegűek, melynek háttérében egy rokon – de nem azonos – transzkriptóma áll. Az előzőekben ismertetett eredményeink azt a mások által is megfogalmazott (Bianco és mtsai 2008) következtetést engedik megerősíteni, hogy a megszületés utáni MSK-k nagy valószínűséggel mesodermális eredetűek. Hozzá kell tenni azonban, hogy az arckoponya területére eső MSK-k eredetét ez a tanulmány nem vizsgálja, és nem is vitatjuk azok dúclécből való – tehát ectodermális - származását.



29. ábra: A különböző szervekből kinyert MSC-k géneexpressziós mintázatának sematikus ábrázolása. A valamennyi stroma sejtre jellemző „közös transzkriptóma” (késsel színezve) mellett olyan gének is kimutathatók bennük, amelyek csak egy adott szöveti forrásból származó sejtekre jellemzőek (sárgával színezve). A sejtek különbözőségére utal továbbá a sejtpopulációként eltérő egyedi Hox kódjuk.

Megvizsgáltuk továbbá a *Dlx1*, a *Six4* és az *Mlx* gének átíródását, hogy jobban behatárolhassuk az ontogenezisnek azt az időpillanatát, amikor a sejtek elköteleződnek a mesenchymális őssejt sors irányába. Megtörténik-e már az elköteleződés a fejlődés azon szakaszában, amikor a postszegmentációs mesoderma és belőle a somiták létrejönnek? A *Dlx* család génjei az agy fejlődésében és az egyes agyhólyagok elhatárolódásában, az arckoponya struktúráinak, valamint az tengely- és végtagvázak csontjainak kialakításában játszanak szerepet (Kraus és mtsai 2006). A *Six4* egérben az embrionális élet 8. napjától kezdődően átfedő kifejeződési mintázatot mutat a somitákban, a végtagbimbókban, a gerincvelő hátulsó gyökerének dúcaiban és az

aortaívekben, valamint egyes belső szervek fejlődésében is szerepet játszik (Ando és Sato 2005). Még frissebb tanulmányok szerint a Six4 fehérje meghatározó szerepet játszik a sejtciklus néhány átkapcsolási pontjának szabályozásában is (Ford és mtsai 1998). Az Mx vagy más néven Mohawk gén kifejeződését minden, somita eredetű sejtvonalban kimutatták egér egyedfejlődésével foglalkozó munkákban. Az Mx az embrionális élet 9. napjától kezdődően fejeződik ki a dermomyotom dorsomedialis és ventrolaterális területein úgy, hogy egy anterior-posterior irányú gradienst hoz létre. A somiták további érésével az inak kialakításáért felelős syndetomban és a sclerotom eredetű, kondenzálódó mesenchyma területeken is átíródik, mely utóbbiak a proximális bordákat és csigolyatesteket hozzák majd létre (Anderson és mtsai 2006). Az Mx fehérje - homeodoménje által - képes kötődni a DNS megfelelő helyeihez és így megakadályozni az érintett embrionális szövetek myogén irányú differenciálódását (Anderson és mtsai 2009). A génkiütött egerek inai testszerte alulfajultak. Az inak össztömegének csökkenése ellenére azonban az Mx^{-/-} egerek farki ínkötegeiben a sejtek száma nem tér el jelentősen a vad típusú állatokétól (Anderson és mtsai 2009). Eredményeink szerint ezek a somitafejlődésben kulcsszerepet játszó gének valamennyi MSC kultúrában nagy mennyiségben átíródnak, tekintet nélkül azok szöveti eredetére. Így alátámasztva látjuk azt az elképzelést, miszerint valamennyi szövetben található MSC populáció a postszegmentációs mesodermából, illetve nagy valószínűséggel a somiták területéről eredeztethető. Feltételezésünk mellett szólnak azok a közlemények is, melyekben leírták, hogy a mesoangioblastok – egy multipotens, mesodermális eredetű progenitor sejt típus (Esner és mtsai 2006) - és a leszálló aorta falában található simaizom sejtek is a somitákból származnak (Wasteson és mtsai 2008). Emellett Pouget és munkacsoportja (Pouget és mtsai 2008) leírta, hogy az erek falát határoló ún. fali sejtek mind a sclerotomból fejlődnek. A fali sejtek a kapillárisok esetében a pericytákat, a törzs, a végtagok nagyobb ereiben és az aorta falában pedig a perivasculárisan elhelyezkedő simaizom sejteket jelenti.

A fenti eredményekkel egybehangzóan sikerült azt is igazolnunk, hogy az MSC populációk egyedi “Hox kóddal” vagy másképpen nevezve “Hox gén kifejeződési ujjlenyomattal” bírnak, amely specifikus a sejtek anatómiai eredetére (25. ábra). Egy nemrégiben közölt tanulmányukban Ackema és Charite (Ackema és mtsai 2008) leírták, hogy rágcsálókban a különböző csontokból kinyert MSC-k növekedési képessége

némileg eltér egymástól, annak megfelelően, hogy a csont, amelyből izolálták őket, milyen anatómiai helyzetű volt. Miután a különböző helyekről származó MSC-k helyspecifikus Hox kifejeződési mintázattal bírnak, így nem kizárt, hogy eltérő növekedési képességük hátterében - legalább részben – bizonyos Hox gének eltérő expressziója áll. Chang és munkatársai (Chang és mtsai 2002) pedig arra derítették fényt, hogy az emberi fibroblastok következetesen, egyedi Hox gén mintázatot mutatnak, amely alapján pontosan megkülönböztethetők a különböző régiókra jellemző sejtek. Mások simaizom sejtek (Chi és mtsai 2007) és zsírsejtek (Gesta és mtsai 2006) esetében is igazolták, hogy a rájuk jellemző Hox kód pontosan kijelöli a sejtek eredeti anatómiai elhelyezkedését a szervezeten belül. Ehhez hasonlóan, valamennyi differenciálódott testi sejtünk, és szöveti őssejtünk – beleértve az MSC-ket is – magában hordozza a származási helyére vonatkozó pozicionális információt. A sejtek pozicionális „memóriájának” fejlődéstanilag is nagy a jelentősége. Amellett, hogy a korai embrionális szegmentálódási folyamatokban nélkülözhetetlen, a későbbiekben biztosítja, hogy a bőr, az izmok, vagy éppen a csontok az adott testszervre jellemző módon fejlődjenek (Wang és mtsai 2009). Ebből következik, hogy amennyiben ezt a pozicionális identitást az MSC-k a megszületés után is őrzik, az esetleg behatárolhatja további plaszticitásukat és így regeneratív képességeiket is korlátok közé szoríthatja. Ezt támasztja alá az a kísérlet is, amikor (Creuzet és mtsai 2002) dúcléc sejtekben túlexpresszáltatták a *Hoxa3* génjét, akkor azok nem voltak képesek az első kopolyúívből származó vázelemek képzésére, de az orr septumának kialakítására alkalmassá váltak. Ugyanakkor a *Hoxb4* overexpressziója gátolja az orr-bimbó eredetű csontfejlődést, de támogatja az alsó állkapocs-csont proximális területének kialakulását. A *Hoxa3* és *Hoxb4* géneket egyidejűleg túltermeltetve a sejtekben, azok nem lesznek képesek az arckoponya csontokat létrehozni. A dúclécsejtek idegrendszeri leszármazottainak létrejöttét nem befolyásolja viszont ezen gének hatása. Ellenben, amikor Leucht és mts.-ai (Leucht és mtsai 2008) *Hoxa11* génre pozitív MSC-ket transzplantáltak *Hoxa11*-et nem kifejező környezetbe, vagyis sípcsontból származó stroma sejteket ültettek az állkapocscsontba, a sejtek ott hegszövetet alakítottak ki, ahelyett, hogy hozzájárultak volna az új csont képződéséhez. Érdekes viszont, hogy a mandibuláris – tehát *Hoxa11* negatív - MSC-k képesek voltak a *Hoxa11* pozitív környezethez sikerrel alkalmazkodni, amikor a sípcsont sérülés helyére ültették át őket.

A graft sejtek itt új csont képzésébe kezdtek, anélkül, hogy hegyszövetet hoztak volna létre. Ebből az esetből azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az MSC-k képesek ugyan újabb Hox géneket is működésbe hozni bizonyos környezeti hatásokra, de még az új szöveti környezet sem képes a már előzőleg rögzült pozicionális kódjukat kitörölni. Sőt könnyen lehet, hogy a normál környezetben zajló, vagyis beavatkozással nem járó szöveti regeneráció is hasonló együttműködésen alapul a sérült területre érkező endogén, de más szövetekből származó őssejtek és a sérült szöveti környezet között.

Jelen tanulmány egyik legfontosabb eredménye, hogy sikerült olyan géneket azonosítanunk, amelyek a különböző anatómiai eredetű MSC populációkra preferenciálisan jellemző módon, és nagy mennyiségben átíródnak (29. ábra). Ebben az értelemben a *Tbx5* és az *Fgf10* mRNS-ek kizárólag a thymus eredetű MSC-kre jellemzőek, ott viszont igen nagy mennyiségben keletkeznek. Korábbi tanulmányokból ismert (Li és mtsai, 1997), hogy az FGF10 hiányának funkcionális következménye, hogy már a korai embrionális állapotban megreked a thymus fejlődése. Ennek hátterében az állhat, hogy a *Tbx5*/FGF10 jelátviteli út alapvető jelentőségű a thymus normális fejlődéshez, különösen ami a thymus epitheliális sejtjeinek proliferációját és érését illeti (Li és mtsai, 1997). A *Tbx5*-öt létfontosságúnak írták le számos gerinces faj, köztük az egér és az ember mellső/felső végtagjának kialakításában is. Olyannyira, hogy *Tbx5* hiányában még a mellső/felső végtagbimbó sem alakul ki (Revest és mtsai 2001). Emellett ismert, hogy a *Tbx5* közvetlenül aktiválja az *Fgf10* gént, ami “cserében” fenntartja a *Tbx5* expressziót a végtag kifejlődése során. A fentiekkel egybehangzó okok állnak az örökletes Holt-Oram szindróma hátterében is. A kóros haplotípus jellemzője a *TBX5* gén elégtelen kifejeződése, mely az érintett személyekben a felső végtagok és a szív fejlődési rendellenességeihez vezet. A *Tbx5*-ön kívül a *Pitx2* is a felső végtagokban fejeződik ki, már az embriogenezistől kezdve egészen a felnőttkorig. Ha túltermeltetjük a gént a felső végtag fejlődése során, az súlyos ín, izom és csont fejlődési rendellenességekhez vezet (Holmberg és mtsai 2008). Végül pedig, az *Alx1* által kódolt fehérje kizárólag a chondrocyta sejtvonalakban expresszálódik az embrionális fejlődés során. Noha ennek célgénjét még nem találták meg, a gén működését gátló vizsgálatokban sikerült megmutatni, hogy az *Alx1* fontos szerepet játszik az arckoponya csontok és a mellső végtagok kialakításában, méghozzá egy másik homeoproteinnel, az *Alx4*-gyel való együttműködése révén (Beverdam és mtsai

2001, Qu és mtsai 1999). A *Tlx1* mRNS különösen nagy mennyiségben keletkezik a lép eredetű MSC-kben. Eredményeink összecsengenek Roberts és munkacsoportja (Roberts és mtsai 1994) által leírt adatokkal. Korábbi kiterjedt vizsgálatok igazolják, hogy a *Tlx1* elengedhetetlen a lép kialakulása, fejlődése és növekedése során. A *Tlx1*-null mutáns egerek életképesek és semmilyen más elváltozás nem mutatható ki bennük azon kívül, hogy nincs lépük. A lép előtelepe ezekben az állatokban az embrionális élet 13.5 napjáig normálisan fejlődik, de azt követően - feltehetően az elégtelen mesenchymális proliferáció okán - már nem növekszik tovább (Kanzler és mtsai 2001, Brendolan és mtsai 2007). A fejlődő lép mesenchymája szoros kapcsolatban áll a dorsálisan fejlődő pancreastelep mesenchymájával. Mindkettő kifejez egy másik, szintén evolúciós értelemben konzervált homeobox gént, az *Nkx2.5*-öt, melyet az általunk vizsgált lép eredetű MSC-k is átírnak. Ennek a génnek a terméke gátolja a myofibroblast irányú differenciációt, melynek fontos homeosztatisz szerepe lehet akkor, amikor szöveti sérülés hiányában nem indokolt a myofibroblastok keletkezése (Hu és mtsai 2010). A *Pitx1*, egy paired-típusú homeodomén transzkripciós faktor, amely a hátsó végtag elkülönítésében és további struktúráinak kialakításában játszik szerepet (Meijlink és mtsai 1999). Eredményeink szerint nagy mennyiségben íródik át a fiatal és a felnőtt egerekből származó combcsont eredetű MSC-kben, a többi stroma sejt populációban azonban nem lehet kimutatni. A JAo-MSK-k is kifejeznek néhány, csak rájuk jellemző gént. Elsőként az *En2*-t említjük, amely nélkülözhetetlen a közép- és köztiagy kialakításához, a kisagy helyének kijelöléséhez, valamint a feji izmok meghatározódásához (Sarnat és mtsai 2002, Herrup és mtsai 2005). Az *En2* gén JAo-MSK-kben való nagymértékű kifejeződésének jelentősége egyelőre nem világos. A másik, JAo-MSK-kben jellemzően kimutatható gén a *Gdf6* viszont fontos lehet az aortafal merevségének megtartásában és az elmeszesedés megakadályozásában. A *Gdf6* termékéről, a BMP-13-ról - több mesenchyma származék vonatkozásában is, mint amilyenek az inak és a porcok - megállapították, hogy képes elejét venni a csont irányú differenciálódásuknak (Chang és mtsai 1994). Sőt, a BMP-13 kötőszöveti sérülést követő gyógyulási folyamatokban új inak kialakítását, és a chondrocytákra jellemző proteoglycanok képződését képes indukálni (Bobacz és mtsai 2002). Az örökletes Klippel-Feil szindróma hátterében a BMP-13-nak mutáció okozta inaktiválódása áll. A betegség a nyakcsigolyák veleszületett összenövésével jár (Tassabehji és mtsai 2008). A

génkiütött egérmodellben az inak, porcok és az ízületek fejlődési rendellenességei is társulnak ehhez (Settle és mtsai 2003).

Az En2, Pitx1, Tbx5 és a Tlx1 géntermékeket immunfluoreszcens módszerrel is megvizsgáltuk és igazoltuk, hogy a fehérje mindenhol jelen volt az érintett sejt kultúrában, vagyis sorrendben az aortafal, a combcsont, a lép, és a thymus eredetű MSC tenyészetekben.

Eredményeink alapján azt mondhatjuk, hogy egérben a megszületést követő hetekben és a felnőtt szervezetben a különböző szövetekben jelen lévő mesenchymális őse- illetve progenitor sejt populációk az embrionális fejlődés során, a mesoderma feldarabolódását követően alakulnak ki, és a különböző testszelvényekben egy időben meginduló, párhuzamos sejtfejlődés eredményei lehetnek. Következtetésünket alátámasztja az MSC-k morfológiai sokfélesége és egyedi “Hox kódjába” írt pozicionális memóriája. További bizonyítékkul szolgál, hogy preferenciálisan fejeznek ki olyan transzkripciós faktorokat, amelyek az adott szerv vagy szövet embrionális fejlődésében is nélkülözhetetlen szereppel bírnak. Ilyenek a somitákra jellemző Mxk, a hátsó végtagot meghatározó Pitx1, a thymus fejlődésben átíródó Tbx5 és a lépfejlődéshez elengedhetetlen Tlx1 transzkripciós faktor. A sejtek topografikus hovatartozása, illetve ennek sejt szintű emlékei a különböző szöveti eredetű kultúrákban még igen hosszú távú *in vitro* tenyésztés (10-15 átvétel) után is megőrződtek. Ezek az eredmények összhangban vannak mások közleményeivel, amelyekben különböző sejt típusok pozicionális emlékeinek jelentős mértékű megtartásáról számolnak be (Ackema és mtsai 2008, Chi és mtsai 2007, Gesta és mtsai 2006).

Eredményeink döntő jelentőséggel bírhatnak a regeneratív orvoslás számára. A különböző anatómiai helyekről származó MSC-k hasonló mértékben bizonyultak plasztikusnak, valamennyi képes csont, porc és zsír irányban eldifferenciálódni *in vitro*. Ugyanakkor korántsem biztos, hogy regeneratív potenciáljuk *in vivo* is azonos, hiszen a sikeres szöveti regeneráció során meghatározó lehet, hogy az MSC graft szövet-specifikus topográfiai memóriája és a sérült célszövet anatómiai helyzete egymásnak megfeleljenek. Az utóbbi elképzelést támasztja alá az a megfigyelés is, miszerint az emberi MSC-k szöveti eredetük függvényében, különböző mértékben képesek a szív regenerációját elősegíteni (Gaebel és mtsai 2011), illetve beépülni a disztrófias szívizomzatba (Vieira és mtsai 2010). További bizonyítékként szolgál emellett Badriék

(Badri és mtsai 2011) beszámolója arról a kölcsönhatásról és az általa indított jelútról az MSC-k és a tüdő epithel sejtjei között, amikor is az MSC-k azt a szövetet telepítették be, amelyből eredetileg kinyerték őket. Ugyanakkor nem zárhatjuk ki, hogy az eltérő eredetű MSC-k képesek lehetnek egymás helyettesítésére, hiszen ismert, hogy a csontvelői MSC-k mobilizálódnak és a súlyos sérülések, vagy a tumor kialakulás helyére vándorolnak (Karp és mtsai 2009). Sőt, mi magunk is beszámolhattunk arról, hogy a csontvelői, lép és aorta eredetű MSC-k – vérképző őssejtekkel együtt alkalmazva - képesek voltak a streptozotocin indukálta diabetes kialakulását megakadályozni egerekben (Hegyí és mtsai 2010, Urbán és mtsai 2008). A thymus eredetű sejtek azonban erre nem voltak alkalmasak. Az ellentmondások tisztázására további *in vivo* sejtvonal követési vizsgálatok szolgáltatathatnának magyarázatot.

6. Következtetések

Az előzőekben ismertetett eredményeink tükrében azt a következtetést fogalmazzuk meg, hogy

(i) 14 napos és 10-12 hetes egér csontvelejéből, zsírszövetéből, lépéből, thymusából és aorta falából kinyerhető adherens stroma sejtek legfőbb jellegzetességeik alapján MSC-knek tekinthetők.

A csontvelőhöz hasonlóan a többi szöveti eredetű stroma sejt is adherens, kisebb-nagyobb mennyiségben kifejeznek CD44, CD73 és CD90 sejt felszíni antigéneket, de nem expresszálnak vérképző és endothel sejtekre jellemző molekulákat. A markerek tekintetében csupán mennyiségi eltéréseket tapasztaltunk, minőségi különbségek nincsenek köztük. Ugyanakkor mind a 6 sejt vonal képes differenciálódni adipocytá és osteoblast irányokba, noha némileg eltérő mértékben. Ennek okát abban látjuk, hogy az adott szöveti környezet kisebb-nagyobb mértékben, de befolyásolja az adott sejt populáció jellemzőit és funkcióját.

(ii) Az általunk vizsgált MSC-k a mesodermából alakultak ki, ugyanis valamennyi MSC populációnk igen nagy mennyiségben fejez ki mesenchymalis és mesodermális sejtekre jellemző molekulákat. Számos klasszikus HOX gén vizsgálata alapján kiderült, hogy minden egyes MSC sejt populáció eltérő HOX gén mintázattal jellemezhető. Ez a „HOX kód” teljesen egyedi és ezáltal, egyfajta pozicionális információt hordoz a sejtek eredeti anatómiai elhelyezkedésére vonatkozóan.

A somiták fejlődésével összefüggésbe hozható nem klasszikus HOX gének közé tartozó *Mkx* és *Dlx1* gének vizsgálata alapján kiderült, igen nagy mennyiségben fejeződnek ki valamennyi általunk vizsgált MSC kultúrában. Ez alapján azt feltételezzük, hogy **az MSC-k ontogenetikus eredete a mesodermán belül is a somitákhoz köthető.**

(iii) Az eltérő szövetekből származó MSC-k testtájanként eltérőek.

Megfigyeltük, hogy az eltérő szövetekből származó MSC-k olyan transzkripciós faktorokat kódoló géneket is kifejeznek, amelyek csak egy-egy szövetből kinyert sejtekben voltak mérhetőek, még hozzá igen nagy mennyiségben. Ilyen módon a Pitx1 a

csontvelő, a Tbx5 a thymus, Tlx1 a lép, az En2 az aorta fali stroma sejtekben volt egyedül megtalálható. Mindezen megfigyeléseket azzal magyarázzuk, hogy a sejtek kialakulása egységes lehet, mely helyileg és időben a postszegmetációs mesoderma, pontosabban a somiták kialakulásának helyére és idejére tehető. Majd később, ahogyan a somiták feldarabolódásával az egyes testszelvények megjelennek, úgy az MSC-k is szétvándorolnak, és az eltérő testtájak területén kialakuló szövetekben telepednek meg. Ott aztán amellet, hogy megőrzik eredeti genetikai emlékezetüket, az új környezethez alkalmazkodva újabb jellegeket is felvesznek (egyedi morfológia, némileg eltérő differenciációs és immunmodulációs képesség). A sejtek a magukban hordozott, leszármazásukra utaló emlékezetüket még *in vitro* sejt kultúrában tartva sem veszítik el, ahogyan azt kísérleteinkben is sikerült bizonyítanunk.

Eredményeink nagy jelentőséggel bírnak a humán terápia felhasználás, ezen belül is a regenerációs orvoslás számára, hiszen ezidáig azt gondoltuk, hogy a test szinte bármely régiójából származó MSC-k képesek egymást pótolni. Ennek oka, hogy eddig szinte semmit sem tudtunk az MSC-k filogenezisééről, de még arról sem, hogy a sejtek természetben mennyire őrzik meg (epi)genetikai memóriájukat. Munkánk nagymértékben hozzájárulhat új és meglévő, MSC-vel kapcsolatos genetikai kutatások és klinikai kísérleti kipróbálások előre mozdításához.

7. Összefoglalás

A mesenchymalis ősz- vagy stroma sejtek (MSC-k) az őssejtek egyik legígéretesebb típusának számítanak orvosi felhasználás szempontjából. Az intenzív kutatások ellenére azonban keveset tudunk az MSC-k biológiai funkciójáról és ontogeneziséről. Azt már tudjuk róluk, hogy szinte minden szövetben, szervben megtalálhatók, illetve hogy morfológiában, differenciálódási képességben és immunuszuppresszív aktivitásban is van némi különbség az eltérő szervekből izolált sejtpopulációk között (Hegyvi és mtsai 2010). Fontos volna tehát tisztázni, hogy az MSC-k vajon egy közös ősz leszármazottai, vagy a köztük lévő különbségek abból fakadnak-e, hogy egymástól függetlenül, párhuzamosan alakulnak ki a különböző testtájakon.

Kérdésünk eldöntésére felnőtt C57Bl/6 egerek csontvelői és zsír eredetű MSC-inek és 14 napos állatok csontvelői, lép, thymus és aorta fali MSC-inek immunológiai sajátosságait, differenciálódási képességét és génexpressziós mintázatát hasonlítottuk össze (Sági és mtsai 2012). Összesen 177 gén expresszióját határoztuk meg PCR array és kvantitatív RT-PCR segítségével. A génexpressziós eredmények egy részét fehérje szinten is validáltuk áramlási citometriával, immunfluoreszcenciával és Western blottal.

Eredményeink szerint az eltérő eredetű MSC populációk egységesen és nagy mennyiségben fejeznek ki olyan mesenchymalis markereket, mint az α -simaizom aktin, 1-es típusú kollagén α -lánc, GATA6, Mohawk és vimentin. A vizsgált Hox gének ugyanakkor eltérő mintázat szerint fejeződnek ki bennük, amely mintázat utal az adott sejtpopuláció eredeti anatómiai helyére. Sőt, az egyes MSC kultúrák olyan egyedi transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek kizárólag az adott sejtpopulációra jellemzőek és összefüggésbe hozhatók a sejtek eredeti származási helyével. Ennek megfelelően a thymus eredetű MSC-k nagy mennyiségben írnak át *Tbx5*-öt and *Pitx2-t*, a lép eredetű MSC-k *Tlx1*-et és *Nkx2.5*-öt, a femurok csontvelejéből származó sejtek *Pitx1-et*, az aorta fali MSC-k pedig *En2*-ből fejeznek ki nagy mennyiséget. Ilyen módon az MSC-k az *in vitro* tenyésztés során is megőrzik hovatartozásukat és memóriájukat.

Feltételezzük ezek alapján, hogy a különböző szövetekben található mesenchymalis sejt populációk egy helyen alakulnak ki, és a mesoderma feldarabolódása után párhuzamosan fejlődnek a különböző testszelvényekben. Eredményeinknek a regeneratív orvoslás szempontjából nagy gyakorlati jelentősége lehet, hiszen a különböző testtájokról származó MSC-k egyáltalán nem biztos, hogy helyettesíthetik egymást.

Summary

Mesenchymal stem or stromal cells (MSCs) originally isolated from bone marrow are one of the most promising stem cell types used in medical practice. Despite this, a completely undefined area of MSC biology is the ontogeny of the cells. Although MSCs of distinct tissue origin have a large number of similarities and differences, it has not been determined so far whether tissue-resident MSCs are the progenies of one ancestor cell lineage or the results of parallel cell developmental events.

Here we compared the immunophenotype, differentiation potential and gene expression profile of MSCs derived from adult and juvenile bone marrow, adult adipose tissue, as well as juvenile spleen, thymus and aorta wall (Hegyí et al 2010). The expression levels of totally 177 genes were measured in murine MSCs derived from different organs and tissues using PCR Array and quantitative RT-PCR. For these purposes we chose 2 different PCR Arrays, one of which contains pluripotency genes, typical mesenchymal and mesodermal marker genes and MSC specific genes and the other one is specific different homeobox genes. Results were then partially validated at protein level by flow cytometry, immunofluorescence and Western blot (Sági et al 2012).

Our results show that all MSC lines uniformly expressed a large set of genes including well-known mesenchymal markers, such as α -smooth muscle actin, collagen type I α -chain, GATA6, Mohawk, and vimentin. On the other hand, different MSC lines consistently expressed distinct patterns of *Hox* genes determining the positional identity of a given cell population. Moreover, MSCs of different origin expressed a few other transcription factors also reflecting their topological identity and so the body segment or organ to which they normally contributed *in vivo*. Accordingly, thymus-derived cells specifically expressed *Tbx5* and *Pitx2*; spleen-derived MSCs were characterized with *Tlx1* and *Nkx2.5*; *Pitx1* designated femoral bone marrow cells and *En2* appeared in aorta-derived MSCs. Thus, MSCs exhibited topographic identity and memory even after long term cultivation *in vitro*.

Based on these results, we suggest that postnatal MSCs isolated from different anatomical sites descend from precursor cells developing in the post-segmentation mesoderm after its regionalization. Our new findings may have crucial consequences for the regenerative medicine because it is possible that MSCs from different body segments can't substitute each other.

8. Irodalomjegyzék

Ackema KB, Charite J. (2008) Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev*, 17:979–991.

Aggarwal S, Pittenger MF. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105:1815-22.

Amores A, Force A, Yan YL, Joly L, Amemiya C, Fritz A és mtsai (1998) Zebrafish hox clusters and vertebrate genome evolution. *Science*, 282:1711–1714.

Anderson DM, Arredondo J, Hahn K, Valente G, Martin JF, Wilson-Rawls J, Rawls A. (2006) Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Dev Dyn*, 235:792–801.

Anderson DM, Beres BJ, Wilson-Rawls J, Rawls A (2009) The homeobox gene Mohawk represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev Dyn*, 238:572–580.

Ando Z, Sato S, Ikeda K and Kawakami K. (2005) Slc12a2 is a direct target of two closely related homeobox proteins, Six1 and Six4. *FEBS J*, 272:3026–3041.

Anjos-Afonso F, Siapati EK and Bonnet D. (2004) In vivo contribution of murine mesenchymal stem cells into multiple cell-types under minimal damage conditions. *Journal of Cell Science*, 117: 5655-5664.

Anjos-Afonso F, Bonnet D. (2007) Nonhematopoietic/ endothelial SSEA-1 + cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*, 109:1298–1306.

Anjos-Afonso F, Bonnet D. (2007) Flexible and dynamic organization of bone marrow stromal compartment. *Br J Haematol*, 139:373-84.

Aulehla A, Wiegraebe W, Baubet V, Wahl MB, Deng C, Taketo M, Lewandoski M, Pourquie' O. (2008) A beta-catenin gradient links the clock and wavefront systems in mouse embryo segmentation. *Nat Cell Biol*, 10:186–193.

Badri L, Walker NM, Ohtsuka T, Wang Z, Delmar M, Flint A, Peters-Golden M, Toews GB, Pinsky DJ, Krebsbach PH, Lama VN. (2011) Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 45:809–816.

Beltrami AP, Cesselli D, Bergamin N és mtsai. (2007) Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*, 110:3438.

Beverdam A, Meijlink F. (2001) Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development. *Mech Dev*, 107:163–167.

Bianco P, Riminucci M, Gronthos S, Robey PG. (2001) Bone Marrow Stromal Stem Cells: Nature, Biology, and Potential Applications. *Stem Cells*, 19: 180-192.

Bianco P, Robey PG, Saggio I, Riminucci M. (2010) "Mesenchymal" stem cells in human bone marrow (skeletal stem cells): a critical discussion of their nature, identity, and significance in incurable skeletal disease. *Hum Gene Ther*; 21:1057-66.

Bobacz K, Gruber R, Soleiman A, Graninger WB, Luyten FP, Erlacher L. (2002) Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and -2 are endogenously expressed in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 10:394–401.

Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. (2007) Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*, 29:166–177.

Buckingham M, Relaix F. (2007) The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 23:645–673.

Caplan AI, Dennis JE. (2006) Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*, 98:1076-84.

Caplan AI, Correa D. (2011) The MSC: an injury drugstore. *Cell Stem Cell*, 9:11-5.

Carlson BM. *Human Embryology and Developmental Biology*. Elsevier, St. Louis, 2004: 89.

Chang HY, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. (2002) Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci USA*, 99:12877–12882.

Chang SC, Hoang B, Thomas JT, Vukicevic S, Luyten FP, Ryba NJ, Kozak CA, Reddi AH, Moos M Jr. (1994) Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem*, 269:28227–28234.

Chapman DL, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. (1996) Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*, 206:379–390.

Cheng H, Leblond CP. (1974) Origin, differentiation and renewal of the four main epithelial cell types in the mouse small intestine. V. Unitarian Theory of the origin of the four epithelial cell types. *Am J Anat*, 141:537-61.

Chi JT, Rodriguez EH, Wang Z, Nuyten DS, Mukherjee S, van de Rijn M, van de Vijver MJ, Hastie T, Brown PO. (2007) Gene expression programs of human smooth muscle cells: tissue-specific differentiation and prognostic significance in breast cancers. *PLoS Genet*, 3:1770–1784.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107: 367-372.

Covas DT, Panepucci RA, Fontes AM, Silva WA Jr, Orellana MD, Freitas MC, Neder L, Santos AR, Peres LC, Jamur MC, Zago MA. (2008) Multipotent mesenchymal stromal cells obtained from diverse human tissues share functional properties and gene-expression profile with CD146+ perivascular cells and fibroblasts. *Exp Hematol*, 36:642-54.

Creuzet S, Couly S, Vincent C, Le Douarin NM. (2002) Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development*, 129:4301–4313.

Crisan M, Yap S, Casteilla L, Chen CW, Corselli M, Park TS et al. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell Stem Cell*, 3:301-13.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci*, 119:2204.

De Bari C, Dell'Accio F, Tylzanowski P, Luyten FP. (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis Rheum*, 44:1928-42.

Dexter TM et al. (1976) Differentiation and proliferation of hemopoietic cells in culture. *Methods Cell Biol*, 14:387–405.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I és mtsai. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8:315-7.

Duboule D, Dolle P. (1989) The structural and functional organization of the murine HOX gene family resembles that of *Drosophila* Hox genes. *EMBO J*, 8:1497-1505.

Esner M, Meilhac SM, Relaix F, Nicolas JF, Cossu G, Buckingham ME. (2006) Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development*, 133:737–749.

Evans PM, Liu C. (2008) Roles of Krupel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin*, 40:554–564.

Forbes SJ, Vig P, Poulson R, Wright NA and Aliston MR. (2002) Adult stem cell plasticity: new pathways of tissue regeneration become visible. *Clinical Science*, 103:355-369.

Ford HL. (1998) Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? *Cell Biol Int*, 22:397–400.

Fraser JK, Wulur I, Alfonso Z, Hedrick MH. (2006) Fat tissue: an underappreciated source of stem cells for biotechnology. *Trends Biotechnol*, 24:150-4.

Friedenstein AJ, Gorskaja JF, Kulagina NN. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*, 4:267-74.

Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*, 20:263-72.

Fukuchi Y, Nakajima H, Sugiyama D, Hirose I, Kitamura T, Tsuji K. (2004) Human placenta-derived cells have mesenchymal stem/progenitor cell potential. *Stem Cells*, 22:649-58.

Gaebel R, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, Wang W és mtsai. (2011) Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One*, 6:e15652.

Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. (2007) SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*, 109:1743–1751.

Gao J, Dennis JE, Muzic RF, Lundberg M, Caplan AI. (2001) The dynamic in vivo distribution of bone marrow-derived mesenchymal stem cells after infusion. *Cells Tissues Organs*, 169:12-20.

Garcia-Fernandez J. (2005) The genesis and evolution of the homeobox gene cluster. *Nat Rev Genet*, 6:881-92.

Gesta S, Bluher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. (2006) Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103:6676–6681.

Gronthos S, Franklin DM, Leddy HA, Robey PG, Storms RW, Gimble JM. (2001) Surface protein characterization of human adipose tissue-derived stromal cells. *J Cell Physiol*, 189:54-63.

Gronthos S, Arthur A, Bartold PM, Shi S. (2011) A method to isolate and culture expand human dental pulp stem cells. *Methods Mol Biol*, 698:107-21.

Gruss P, Kessel M. (1991) Axial specification in higher vertebrates. *Curr Opin Genet Dev*, 1: 04–210.

Guo Z, Li H, Li X és mtsai. (2006) In vitro characteristics and in vivo immunosuppressive activity of compact bone-derived murine mesenchymal progenitor cells. *Stem Cells*, 24:992.

Hall B, Andreeff M, Marini F. (2007) The participation of mesenchymal stem cells in tumor stroma formation and their application as targeted-gene delivery vehicles. *Handb Exp Pharmacol*, 180:263-83.

Haniffa MA, Collin MP, Buckley CD, Dazzi F. (2009) Mesenchymal stem cells: the fibroblasts' new clothes? *Haematologica*, 94:258.

Hegyí B, Sági B, Kovács J, Kiss J, Urbán VS, Mészáros G, Monostori É, Uher F. (2010) Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int Immunol*, 22:551–559.

Hegyí B, Sági B, Kudlik G, Uher F. (2012) A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladáso- és immunfolyamatok szabályozásában. *Immun. Szemle*, IV:4-10.

Herrup K, Murcia C, Gulden F, Kuemerle B, Bilovocky N. (2005) The genetics of early cerebellar development: networks not pathways. *Prog Brain Res*, 148:21–27.

Herzog EL, Chai L, Krause DS. (2003) Plasticity of marrow-derived stem cells. *Blood*, 102:3483-93.

Holmberg J, Ingner G, Johansson C, Leander P, Hjalt TA. (2008) PITX2 gain-of-function induced defects in mouse forelimb development. *BMC Dev Biol*, 8:25.

Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC, Deans RJ, Krause DS, Keating A. (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *International Society for Cellular Therapy. Cytotherapy*, 7:393-5.

Hu B, Wu YM, Wu Z, Phan SH. (2010) Nkx2.5/Csx represses myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 42:218–226.

Iimura T, Pourquie O. (2007) Hox genes in time and space during vertebrate body formation. *Develop. Growth Differ*, 49:265-275.

Ito Y, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H. (2010) The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107:10538–10542.

Javazon EH, Beggs KJ, Flake AW. (2004) Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*, 32:414-25.

Kanzler B, Dear TN. (2001) Hox11 acts cell autonomously in spleen development and its absence results in altered cell fate of mesenchymal spleen precursors. *Dev Biol*, 234:231–243.

Karp JM, Leng Teo GS. (2009) Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*, 4:206–216.

Kern S, Eichler H, Stoeve J, Klüter H, Bieback K. (2006) Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 24:1294-301.

Knittel T, Kessel M, Kim MH, Gruss P. (1995) A conserved enhancer of the human and murine Hoxa-7 gene specifies the anterior boundary of expression during embryonal development. *Development*, 121:1077–1088.

Krampera M. (2011) Mesenchymal stromal cells: more than inhibitory cells. *Leukemia*, 25:565-6.

Kraus P, Lufkin T. (2006) Dlx homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development. *Am J Med Genet A*, 140:1366–1374.

Kubo H, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M, Kaneko E és mtsai. (2009) Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells*, 14:407–424.

Kumar JP. (2009) The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease. *Cell Mol Life Sci*, 66:565–583.

Lagha M, Brunelli S, Messina G, Cumano A, Kume T, Relaix T, Buckingham ME. (2009) Pax3:Foxc2 reciprocal repression in the somite modulates muscular versus vascular cell fate choice in multipotent progenitors. *Dev Cell*, 17:892–899.

Lagha M, Sato T, Regnault B, Cumano A, Zuniga A, Licht J, Relaix F, Buckingham M. (2010) Transcriptome analyses based on genetic screens for Pax3 myogenic targets in the mouse embryo. *BMC Genomics*, 11:696.

Le Blanc K, Tammik L, Sundberg B és mtsai. (2003) Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol*, 57: 11-20.

Le Blanc K, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. (2004) Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*, 363:1439-41.

Lengner CJ, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A, Jaenisch R. (2007) Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*, 1:403–415.

Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. (2008) Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development*, 135:2845–2854.

Levine M, Hoey T. (1988) Homeobox proteins as sequence-specific transcription factors. *Cell*, 55:537-540.

Li QY, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson C és mtsai. (1997) Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet*, 15:21–29.

Mackenzie IC. (1970) Relationship between mitosis and the ordered structure of the stratum corneum in mouse epidermis. *Nature*, 226:653–655.

Mansilla E, Marin GH, Sturla F, Drago HE, Gil MA, Salas E, Gardiner MC, Piccinelli G, Bossi S, Salas E, Petrelli L, Iorio G, Ramos CA, and Soratti C. (2005) Human mesenchymal stem cells are tolerized by mice and improve skin and spinal cord injuries. *Transplantation Proceedings*, 37:292-294.

Mary-Lee Dequéant, Olivier Pourquié. (2008) Segmental patterning of the vertebrate embryonic axis. *Nature Reviews Genetics*, 9:370-382.

Mauro A. (1961) Satellite cells of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9:493–495.

McGinnis W, Krumlauf R. (1992) Homeobox genes and axial patterning. *Cell*, 68:283-302.

Meirelles L da S, Nardi NB. (2003) Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol*, 123:702-11.

Meijlink F, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC, Berge DT. (1999) Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol*, 43:651–663.

Mendes SC, Robin C, Dzierzak E. (2005) Mesenchymal progenitor cells localize within hematopoietic sites throughout ontogeny. *Development*, 132:1127-36.

Menicanin D, Bartold PM, Zannettino AC, Gronthos S. (2009) Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*, 5:36–50.

Minasi MG, Riminucci M, De Angelis L, Borello U, Berarducci B, Innocenzi A, Caprioli A, Sirabella D, Baiocchi M, és mtsai. (2002) The meso-angioblast: a multipotent, self-renewing cell that originates from the dorsal aorta and differentiates into most mesodermal tissues. *Development*, 129:2773–2783.

Morikawa S, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. (2009) Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*, 379:1114–1119.

Nauta AJ, Fibbe WE. (2007) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells. *Blood*, 110:3499-3506.

Peister A, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood*, 103:1662–1668.

Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*, 284:143-7.

Pouget C, Pottin K, Jaffredo T. (2008) Sclerotomal origin of vascular smooth muscle cells and pericytes in the embryo. *Dev Biol*, 315:437–447.

Puissant B, Barreau C, Bourin P, Clavel C, Corre J, Bousquet C, Taureau C, Cousin B, Abbal M, Laharrague P, Penicaud L, Casteilla L, Blancher A. (2005) Immunomodulatory effect of human adipose tissue-derived adult stem cells: comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Br J Haematol*, 129:118-29.

Qu S, Tucker SC, Zhao Q, deCrombrughe B, Wisdom R. (1999) Physical and genetic interactions between *Alx4* and *Cart1*. *Development*, 126:359–369.

Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*, 83:71-6.

Revest JM, Suniara RK, Kerr K, Owen JJ, Dickson C. (2001) Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol*, 167:1954–1961.

Reynolds BA, Weiss S. (1992) Generation of neurons and astrocytes from isolated cells of the adult mammalian central nervous system. *Science*, 255:1707–1710.

Riazi AM, Takeuchi JK, Hornberger LK, Zaidi SH, Amini F, Coles J, Bruneau BG, Van Arsdell GS. (2009) *NKX2-5* regulates the expression of beta-catenin and *GATA4* in ventricular myocytes. *PLoS One*, 4:e5698.

Rinn JL, Bondre C, Gladstone HB, Brown PO, Chang HY. (2006) Anatomic demarcation by positional variation in fibroblast gene expression programs. *PLoS Genet*, 2: e119.

Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ. (1994) *Hox11* controls the genesis of the spleen. *Nature*, 368:747–749.

Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. (2003) Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*, 21:105-110

Rubinstein P, Rosenfeld RE, Adamson JW és mtsai. (1993) Stored placental blood for unrelated bone marrow reconstitution. *Blood*, 81:1679 –1690.

Rudnicki MA. (2003) Marrow to muscle, fission versus fusion, *Nature Medicine*, 9:1461-1462.

Sadler TW. *Langman Orvosi embriológia. Medicina, Budapest, 2010: 98*

Sági B, Maraghechi P, Urbán VS, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Németh K, Monostori É, Gócsa E, Uher F. (2012) Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev*, 21:814-28.

Sanchez-Ramos JR, Song S, Cardozo-Pelaez F, Hazzi C, Stedeford T, Willing A, Freeman TB, Saporta S, Janssen W, Patel N, Cooper DR, Sanberg PR. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol*, 167:247-256.

Sanchez-Ramos JR. (2002) Neural Cells Derived from Adult Bone Marrow and Umbilical Cord Blood. *Journal of Neuroscience Research*, 69: 880-893.

Sansregret L, Nepveu A. (2008) The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene*, 412:84–94.

Sarnat HB, Benjamin DR, Siebert JR, Kletter GB, Cheyette SR. (2002) Agenesis of the mesencephalon and metencephalon with cerebellar hypoplasia: putative mutation in the EN2 gene—report of 2 cases in early infancy. *Pediatr Dev Pathol*, 5:54–68.

Scott MP, Tamkun JW, and Hartzell GW III. (1989) The structure and function of the homeodomain. *Biochim. Biophys. Acta*, 989:25-48.

Settle SH, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. (2003) Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse *Gdf6* and *Gdf5* genes. *Dev Biol*, 254:116–130.

Shen B, Bhargava D, Wei A, Williams LA, Tao H, Ma DD, Diwan AD. (2009) BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *Int J Biol Sci*, 5:192–200.

Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24:74-85.

Sreejit P, Dilip KB, Verma RS. (2012) Generation of mesenchymal stem cell lines from murine bone marrow. *Cell Tissue Res*, 350:55-68.

Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K. (1996) The human *GATA-6* gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics*, 38:283–290.

Tang DQ, Cao LZ, Burkhardt BR, Xia CQ, Litherland SA, Atkinson MA, and Yang LJ. (2004) In Vivo and In Vitro Characterization of Insulin-Producing Cells Obtained From Murine Bone Marrow. *Diabetes*, 53: 1721-1732.

Tassabehji M, Fang ZM, Hilton EN, McGaughran J, Zhao Z, de Bock CE, és mtsai. (2008) Mutations in *GDF6* are associated with vertebral segmentation defects in Klippel-Feil syndrome. *Hum Mutat*, 29:1017–1027.

Thomas E, Storb R, Clift RA, Fefer A, Johnson FL, Neiman PE, Lerner KG, Glucksberg H, Buckner CD. (1975) Bone-marrow transplantation (first of two parts). *N Engl J Med*, 292:832-43.

Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998) Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*, 282:1145-7.

Tropel P, Noel D, Platet N, Legrand P, Benabid AL and Berger F. (2004) Isolation and characterisation of mesenchymal stem cells from adult mouse bone marrow. *Exp. Cell Res*, 295:395.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. (2006) Immunoregulatory function of mesenchymal stem cells. *Eur J Immunol*, 36:2566-73.

Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. (2008) Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol*, 8:726-36.

Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Góczy E, Vas V, Monostori É, Uher F. (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells*, 26:244–253.

Urbán VS, Hegyi B, Sági B, Kudlik G, Uher F. (2011) A diabetes mellitus össejtterápiája – az endokrin pancreas regenerációja. *Diab. Hun*, 19:279-286.

Veraksa A, Del Campo M, McGinnis W. (2000) Developmental patterning genes and their conserved functions: from model organisms to humans. *Mol. Genet. Metab*, 69:85-100.

Vieira NM, Zucconi E, Bueno CR, M Secco M, Suzuki MF, Bartolini P, Vainzof M, Zatz M. (2010) Human multipotent mesenchymal stromal cells from distinct sources

show different in vivo potential to differentiate into muscle cells when injected in dystrophic mice. *Stem Cell Rev*, 6:560–566.

Vodyanik MA, Yu J, Zhang X, Tian S, Stewart R, Thomson JA, Slukvin II. (2010) A mesoderm-derived precursor for mesenchymal stem and endothelial cells. *Cell Stem Cell*, 7:718-29.

Wang KC, Helms JA, Chang HY. (2009) Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol*, 19:268–275.

Wardle FC, Papaioannou VE. (2008) Teasing out T-box targets in early mesoderm. *Curr Opin Genet Dev*, 18:418–425.

Wasteson P, Johansson BR, Jukkola T, Breuer S, Akyurek LM, Partanen J, Lindahl P. (2008) Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice. *Development*, 135:1823–1832.

Watt AJ, Zhao R, Li J, Duncan SA. (2007) Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol*, 7:37.

Weng YS, Lin HY, Hsiang YJ, Hsieh CT, Li WT (2003) The effects of different growth factors on human bone marrow stromal cells differentiating into hepatocyte-like cells. *Adv Exp Med Biol*, 534:119-28.

Zhang QZ, Su WR, Shi SH, Wilder-Smith P, Xiang AP, Wong A, Nguyen AL, Kwon CW, Le AD. (2010) Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells*, 28:1856-68.

Zhao S, Wehner R, Bornhauser M, Wassmuth R, Bachmann M, Schmitz M. (2010) Immunomodulatory properties of mesenchymal stromal cells and their therapeutic consequences for immune-mediated disorders. *Stem Cells Dev*, 19:607-614.

Zhu W, Xu W, Jiang R, Qian H, Chen M, Hu J, Cao W, Han C, Chen Y. (2006) Mesenchymal stem cells derived from bone marrow favor tumor cell growth in vivo. *Exp Mol Pathol*, 80:267-74.

Zuk PA, Zhu M, Ashjian P, De Ugarte DA és mtsai. (2002) Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Mol Biol Cell*, 13:4279-95.

9. Publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

1. Beáta Hegyi, Bernadett **Sági**, János Kovács, Judit Kiss, Veronika S. Urbán, Gabriella Mészáros, Éva Monostori, and Ferenc Uher: *Identical, Similar or Different? Learning about Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Various Mouse Tissues: Bone Marrow, Spleen, Thymus, and Aorta Wall*. *International Immunology* 22:551-559. (2010) (IF=3.301)
2. Urbán S. Veronika, Hegyi Beáta, **Sági** Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A diabetes mellitus őssejtterápiája – az endokrin pancreas regenerációja*. *Diabetologia Hungarica* 19:279-286. (2011)
3. Bernadett **Sági**, Pounch Maraghechi, Veronika S. Urbán, Beáta Hegyi, Anna Szigeti, Roberta Fajka-Boja, Gyöngyi Kudlik, Katalin Német, Éva Monostori, Elen Gócza, Ferenc Uher: *Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs is Determined in the Post-Segmentation Mesoderm*. *Stem Cells and Development* 21:814-828. (2012) (IF=4.791)
4. Hegyi Beáta, **Sági** Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladássos- és immunfolyamatok szabályozásában*. *Immunológiai Szemle* IV:4-10. (2012)

A disszertációhoz nem kapcsolódó közlemények:

1. Urbán S. Veronika, Benevolenskaya Elisabeta, Kiss Judit, **Sági** Bernadett, Hegyi Beáta, Uher Ferenc: *A genetikán is túl - Az epigenetika előretörése és orvosi vonatkozásai*. *Orvosi Hetilap* 153:214-221. (2012)

2. Tátrai Péter, **Sági Bernadett**, Szigeti Anna, Szepesi Áron, Szabó Ildikó, Bősze Szilvia, Kristóf Zoltán, Markó Károly, Szakács Gergely, Urbán István, Mező Gábor, Uher Ferenc, Német Katalin: A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces. *Journal of Materials Science- Materials in Medicine* 24:479-488. (2013) (IF=2.141)

10. Köszönetnyilvánítás

Megköszönöm témavezetőmnek, **Prof. Dr. Habil. Uher Ferencnek**, az Őssejt-biológiai laboratórium vezetőjének, hogy az Országos Vérellátó Szolgálatnál szakmai irányítása alatt tudományos munkát végezhettem. Köszönet az értékes tanácsokért, amellyel munkámat segítette, és a sok türelemért és támogatásért.

Köszönöm továbbá **Hegy Beátának**, **Kudlik Gyöngyinek**, **Dr. Vas Virágnak** és **Dr. Kiss Juditnak** – akik hallgatóként szintén az Őssejtbiológia laboratóriumában dolgoztak - hogy szakmai tudásukat és szerzett tapasztalataikat megosztották velem.

Külön köszönettel tartozom **Suhajdáné Dr. Urbán Veronikának**, aki rengeteg hasznos tanáccsal látott el és szinte anyai szeretettel ösztönzött munkám során (is).

Szeretném megköszönni **Ullrich Olga** asszisztensnőnek a mindennapi munkában nyújtott segítőkészségét és szorgalmasságát.

A tudományos együttműködésért és önzetlen szakmai segítségért köszönettel tartozom:

Dr. Kovács Jánosnak (ELTE TTK Anatómiai, Sejt és Fejlődésbiológiai Tanszék)

Dr. Gócza Elenek (MBK, Állatbiológiai Intézet, Gödöllő)

Dr. Monostori Évának (MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai intézet)

Dr. Német Katalinnak (Országos Vérellátó Szolgálat, Kísérletes Génterápiás Laboratórium)

Dr. Pounch Maraghechinek (MBK, Állatbiológiai Intézet, Gödöllő)

Dr. Fajka-Boja Robertának és **Dr. Szebeni Gábornak** (MTA Szegedi Biológiai Központ Genetikai intézet)

Dr. Szilvási Anikónak (Országos Vérellátó Szolgálat, Transzplantációs Immungenetikai Laboratórium)

Pálfi Gézáne Saroltának (ELTE TTK Anatómiai, Sejt és Fejlődésbiológiai Tanszék)

Szigeti Annának (Országos Vérellátó Szolgálat, Kísérletes Génterápiás Laboratórium)

11. Kiegészítő táblázatok

1. Kiegészítő táblázat: A Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array génjei.*

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (JCsV-MSC)			Ct értékek (CsV-MSC)		
			1. kís.	2. kís.	3. kís.	1. kís.	2. kís.	3. kís.
NM_011076	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	32,04	31,24	31,72	29,22	28,88	29,56
NM_009655	Alcam	Activated leukocyte cell adhesion molecule	34,03	33,67	33,75	23,46	23,25	23,40
NM_008486	Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	31,28	31,53	31,34	24,53	24,14	24,26
NM_009673	Anxa5	Annexin A5	21,45	21,49	21,44	21,45	21,15	21,30
NM_007540	Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	28,38	30,61	30,14	27,98	26,26	27,66
NM_007541	Bglap1	Bone gamma carboxyglutamate protein 1	29,55	29,55	29,56	35,02	33,85	34,54
NM_007553	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	40,00	40,00	40,00	40,00	34,54	38,78
NM_007554	Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	28,14	28,32	28,32	26,29	26,13	26,33
NM_007556	Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	33,48	34,96	34,88	31,32	30,25	30,43
NM_007557	Bmp7	Bone morphogenetic protein 7	40,00	40,00	40,00	40,00	36,95	38,35
NM_009810	Casp3	Caspase 3	26,15	27,73	27,34	26,61	25,18	26,42
NM_009851	Cd44	CD44 antigen	24,95	25,81	25,51	22,87	22,25	22,65
NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	22,01	22,17	22,14	20,32	20,19	20,29
NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	29,27	29,67	29,37	28,59	27,38	27,67
NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	36,97	38,90	38,89	27,97	27,05	27,89
NM_007614	Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	24,68	24,24	24,74	23,53	23,22	23,33
NM_010113	Egf	Epidermal growth factor	31,35	31,53	31,43	30,71	30,83	30,35
NM_007932	Eng	Endoglin	27,73	27,66	27,69	25,87	25,54	25,44
NM_001003817	ErbB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	27,58	27,56	27,58	26,28	26,33	26,00
NM_008002	Fgf10	Fibroblast growth factor 10	33,45	34,76	34,67	31,51	30,57	31,07
NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2	29,21	29,30	29,28	29,47	29,61	29,44
NM_008051	Fut1	Fucosyltransferase 1	40,00	40,00	40,00	36,03	34,89	35,90
NM_010242	Fut4	Fucosyltransferase 4	40,00	39,59	39,90	34,14	34,38	34,23
XM_284144	Fzd9	Frizzled homolog 9 (Drosophila)	35,89	38,24	37,42	35,56	36,08	35,45
NM_011819	Gdf15	Growth differentiation factor 15	27,85	28,30	28,11	29,45	29,18	29,38
NM_008109	Gdf5	Growth differentiation factor 5	40,00	40,00	40,00	35,07	35,97	35,71
NM_013526	Gdf6	Growth differentiation factor 6	36,92	37,00	36,88	35,63	35,13	35,03
NM_013527	Gdf7	Growth differentiation factor 7	33,63	33,58	33,58	31,93	31,48	31,32
NM_025652	Gtf3a	General transcription factor III A	24,69	24,68	24,69	24,21	23,91	23,89
NM_026115	Hat1	Histone aminotransferase 1	24,85	24,87	24,85	24,36	23,69	24,19
NM_008228	Hdac1	Histone deacetylase 1	25,69	26,57	26,67	25,48	24,49	24,95
NM_010427	Hgf	Hepatocyte growth factor	22,63	22,89	22,69	24,12	23,75	24,04
NM_009327	Hnf1a	HNF1A homeobox A	36,60	36,64	36,59	38,54	36,57	37,54
NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	35,93	36,21	36,10	28,11	27,88	27,99
NM_008337	Iifng	Interferon gamma	40,00	40,00	40,00	32,04	32,08	31,98
NM_010512	Igf1	Insulin-like growth factor 1	24,20	24,30	24,23	24,18	23,78	23,87
NM_010548	Il10	Interleukin 10	36,03	40,00	37,10	31,13	31,08	31,38
NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta	33,32	31,82	32,52	26,80	26,25	26,42
NM_031168	Il6	Interleukin 6	27,30	27,65	27,34	25,25	24,15	24,05
NM_008387	Ins2	Insulin II	40,00	40,00	40,00	40,00	36,76	38,56
NM_008397	Itga6	Integrin alpha 6	29,22	30,02	29,66	27,61	26,36	27,26
NM_008402	Itgav	Integrin alpha V	23,11	23,28	23,20	22,63	22,70	22,43
NM_021334	Itgax	Integrin alpha X	36,75	34,68	35,35	35,79	33,94	34,47
NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	21,37	21,36	21,36	20,26	20,35	20,24
NM_013822	Jag1	Jagged 1	28,52	28,14	28,34	26,82	26,44	26,68
NM_010612	Kdr	Kinase insert domain protein receptor	40,00	40,00	40,00	28,52	28,49	28,50
NM_013598	Kitl	Kit ligand	24,61	25,24	25,03	22,54	21,62	21,52
NM_008501	Lif	Leukemia inhibitory factor	31,00	31,07	31,02	29,49	28,54	28,99
NM_023061	Mcam	Melanoma cell adhesion molecule	28,18	28,32	28,22	29,00	28,64	28,87
NM_008601	Mitf	Micropthalmia-associated transcription factor	26,14	26,13	26,12	24,97	24,87	24,90
NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	22,17	22,12	22,13	23,85	23,11	23,67
NM_016701	Nes	Nestin	30,08	30,05	30,10	27,85	27,96	27,76

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (JCsv-MSC)			Ct értékek (Csv-MSC)		
NM_033217	Ngfr	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	40,00	40,00	40,00	36,65	36,95	36,81
NM_008714	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	29,08	29,11	29,10	30,14	29,65	29,32
NM_011851	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	29,08	29,86	29,16	29,20	29,23	29,21
NM_153561	Nudt6	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	28,08	28,21	28,10	27,88	27,71	27,78
NM_020005	Kat2b	K(lysine) acetyltransferase 2B	24,59	25,01	25,77	23,50	23,49	23,60
NM_008809	Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	23,94	23,69	23,87	23,46	23,45	23,35
NM_201406	Pigs	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	25,46	25,36	25,26	24,02	23,97	23,79
NM_013633	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	29,48	29,71	29,61	29,31	29,80	29,63
NM_011146	Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	24,80	24,89	24,64	26,51	25,91	25,39
NM_008935	Prom1	Prominin 1	40,00	40,00	40,00	40,00	36,85	38,36
NM_007982	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	26,36	26,53	26,23	25,47	25,67	25,26
NM_011210	Ptpnc	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	40,00	40,00	40,00	29,15	25,19	25,15
NM_016802	Rhoa	Ras homolog gene family, member A	21,58	21,89	21,78	20,74	20,34	20,52
NM_009820	Runx2	Runt related transcription factor 2	27,08	27,75	27,24	26,72	26,31	26,81
NM_172773	Slc17a5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	26,93	27,22	27,31	25,98	25,79	25,39
NM_008540	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)	23,37	23,92	23,67	23,57	22,18	22,38
NM_029438	Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	25,45	25,35	25,45	25,06	25,08	25,06
NM_025481	Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	24,27	24,03	24,15	23,82	23,87	23,91
NM_011443	Sox2	SRY-box containing gene 2	40,00	40,00	40,00	32,59	33,27	33,52
NM_011448	Sox9	SRY-box containing gene 9	30,79	31,32	30,92	29,61	28,91	28,85
NM_011537	Tbx5	T-box 5	36,55	37,15	37,07	40,00	37,86	37,63
NM_009354	Tert	Telomerase reverse transcriptase	31,18	30,67	30,37	31,61	31,37	31,39
NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	25,78	25,79	25,79	23,89	23,30	23,47
NM_009368	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	27,04	27,09	27,05	26,90	26,78	26,82
NM_009382	Thy1	Thymus cell antigen 1, theta	34,69	40,00	40,00	33,91	33,96	33,86
NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	40,00	39,05	39,77	25,98	25,70	25,73
NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	25,35	26,74	26,26	28,01	24,49	24,49
NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	24,32	25,13	25,03	24,72	23,67	23,67
NM_011701	Vim	Vimentin	17,27	17,05	17,20	17,21	17,21	17,18
NM_011708	Vwf	Von Willebrand factor homolog	34,12	35,29	35,01	29,61	29,00	29,25
NM_009522	Wnt3a	Wingless-related MMTV integration site 3A	40,00	40,00	40,00	39,34	36,19	38,12
NM_009556	Zfp42	Zinc finger protein 42	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	25,55	25,73	25,73	24,09	22,58	22,58
NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	21,83	21,78	21,82	22,08	21,47	21,85
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	19,34	19,07	19,27	19,78	19,28	19,35
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	19,43	19,49	19,47	18,49	17,97	18,27
NM_007393	Actb	Actin, beta	17,61	17,36	17,66	17,59	17,02	17,42
SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	26,33	27,77	27,46	29,00	27,22	28,42
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	26,26	27,82	27,35	28,55	27,52	28,34
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	26,30	27,74	27,23	28,35	27,30	28,43
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,99	19,98	19,98	23,08	19,07	22,87
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,98	19,88	19,89	22,98	19,24	21,89
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	20,31	19,99	20,03	23,88	18,89	21,94

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (Zs-MSc)			Ct értékek (JAo-MSc)		
			1. kís.	2. kís.	3. kís.	1. kís.	2. kís.	3. kís.
NM_011076	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	33,03	33,13	33,21	27,57	27,51	27,54
NM_009655	Alcam	Activated leukocyte cell adhesion molecule	29,24	40,00	30,33	26,35	26,24	26,30
NM_008486	Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	32,57	26,80	31,55	40,00	40,00	40,00
NM_009673	Anxa5	Annexin A5	21,50	23,53	23,15	21,55	21,32	21,44
NM_007540	Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	26,58	20,79	21,55	24,93	31,63	25,06
NM_007541	Bglap1	Bone gamma carboxyglutamate protein 1	35,71	31,55	34,65	35,57	35,75	35,64
NM_007553	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	40,00	30,49	36,40	28,83	28,96	28,16
NM_007554	Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	24,44	24,08	23,78	25,04	25,37	25,24
NM_007556	Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	27,01	32,57	31,44	24,06	26,68	25,27
NM_007557	Bmp7	Bone morphogenetic protein 7	40,00	29,89	38,20	40,00	40,00	40,00
NM_009810	Casp3	Caspase 3	26,60	27,24	24,45	25,31	30,70	26,07
NM_009851	Cd44	CD44 antigen	23,03	29,98	24,56	23,66	25,79	24,56
NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	20,15	34,14	23,35	22,56	21,92	22,34
NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	31,29	27,82	31,72	28,81	30,80	29,65
NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	30,15	40,00	32,70	32,73	36,00	33,55
NM_007614	Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	23,29	33,93	23,55	23,78	24,67	24,06
NM_010113	Egf	Epidermal growth factor	31,26	36,26	32,30	30,80	30,68	30,70
NM_007932	Eng	Endoglin	29,11	33,15	30,15	26,50	26,56	26,53
NM_001003817	Erbb2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	26,39	40,00	27,77	27,48	26,82	26,99
NM_008002	Fgf10	Fibroblast growth factor 10	32,12	30,17	31,17	40,00	40,00	40,00
NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2	26,71	35,15	30,65	26,09	26,50	26,41
NM_008051	Fut1	Fucosyltransferase 1	35,34	25,16	33,16	38,33	40,00	39,20
NM_010242	Fut4	Fucosyltransferase 4	33,09	33,01	34,40	36,39	38,97	36,90
XM_284144	Fzd9	Frizzled homolog 9 (Drosophila)	36,81	24,22	34,22	35,37	37,34	36,32
NM_011819	Gdf15	Growth differentiation factor 15	32,87	25,03	31,70	36,91	40,00	38,08
NM_008109	Gdf5	Growth differentiation factor 5	40,00	30,27	38,30	40,00	40,00	40,00
NM_013526	Gdf6	Growth differentiation factor 6	29,51	40,00	31,65	24,50	24,02	24,42
NM_013527	Gdf7	Growth differentiation factor 7	34,15	25,57	35,65	32,26	34,58	33,85
NM_025652	Gtf3a	General transcription factor III A	24,23	40,00	26,70	24,67	25,85	25,24
NM_026115	Hat1	Histone aminotransferase 1	23,62	28,94	25,53	24,39	28,80	26,83
NM_008228	Hdac1	Histone deacetylase 1	24,04	32,01	25,30	25,04	30,52	25,85
NM_010427	Hgf	Hepatocyte growth factor	29,21	36,80	28,80	35,37	40,00	36,89
NM_009327	Hnf1a	HNF1 homeobox A	37,99	29,04	36,58	36,48	36,44	36,34
NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	24,59	22,05	25,87	25,72	27,39	26,35
NM_008337	Irfng	Interferon gamma	40,00	35,52	38,20	40,00	40,00	40,00
NM_010512	Igf1	Insulin-like growth factor 1	28,31	25,58	26,56	26,42	27,27	27,07
NM_010548	Il10	Interleukin 10	32,14	22,68	32,30	30,92	31,48	30,89
NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta	40,00	40,00	40,00	35,06	36,51	35,12
NM_031168	Il6	Interleukin 6	28,96	21,23	27,66	26,38	30,91	29,91
NM_008387	Ins2	Insulin II	36,04	27,11	35,05	31,04	30,55	30,78
NM_008397	Itga6	Integrin alpha 6	24,48	29,66	25,43	26,26	33,25	30,24
NM_008402	Itgav	Integrin alpha V	21,63	26,12	22,78	21,25	21,56	21,34
NM_021334	Itgax	Integrin alpha X	40,00	29,93	39,91	40,00	40,00	40,00
NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	20,09	24,76	20,35	21,83	21,62	21,80
NM_013822	Jag1	Jagged 1	25,85	27,85	26,36	25,01	26,23	25,89
NM_010612	Kdr	Kinase insert domain protein receptor	28,23	31,86	30,42	28,82	29,90	29,07
NM_013598	Kitl	Kit ligand	24,80	27,49	24,90	23,91	28,60	24,37
NM_008501	Lif	Leukemia inhibitory factor	28,83	28,98	28,88	27,18	30,50	28,16
NM_023061	Mcam	Melanoma cell adhesion molecule	23,73	40,00	24,80	29,11	30,90	30,08
NM_008601	Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor	31,67	32,09	32,06	30,67	31,13	31,09
NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	28,89	29,64	29,43	22,09	22,99	22,23
NM_016701	Nes	Nestin	28,51	27,46	28,65	33,03	31,65	33,89

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (Zs-MSC)			Ct értékek (JAo-MSC)		
NM_033217	Ngfr	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	37,00	23,30	33,50	40,00	40,00	40,00
NM_008714	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	31,27	28,18	30,78	30,13	31,73	31,07
NM_011851	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	28,68	25,11	28,07	21,89	21,98	21,88
NM_153561	Nudt6	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	26,46	34,95	27,95	25,95	26,97	26,07
NM_020005	Kat2b	K(lysine) acetyltransferase 2B	22,56	31,44	24,86	22,94	25,01	23,05
NM_008809	Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	27,02	28,91	28,44	30,99	30,90	30,92
NM_201406	Pigs	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	25,18	36,64	26,34	26,18	25,83	26,06
NM_013633	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	30,65	25,10	30,55	30,62	30,41	30,42
NM_011146	Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	28,52	40,00	38,40	27,63	29,67	28,64
NM_008935	Prom1	Prominin 1	40,00	21,93	38,80	36,68	40,00	38,88
NM_007982	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	24,44	28,97	25,89	24,60	24,08	24,26
NM_011210	Ptpnc	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	40,00	28,10	39,55	40,00	40,00	40,00
NM_016802	Rhoa	Ras homolog gene family, member A	21,01	24,00	22,60	21,18	24,36	23,38
NM_009820	Runx2	Runt related transcription factor 2	27,95	26,08	28,06	28,31	31,41	30,10
NM_172773	Slc17a5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	27,04	40,00	28,74	26,66	27,96	26,42
NM_008540	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)	22,89	25,79	23,56	22,97	28,87	24,47
NM_029438	Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	25,45	40,00	25,87	25,65	25,59	25,62
NM_025481	Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	24,74	29,92	26,92	24,79	25,14	25,10
NM_011443	Sox2	SRY-box containing gene 2	40,00	36,08	39,86	40,00	37,28	38,26
NM_011448	Sox9	SRY-box containing gene 9	28,68	30,94	30,14	29,58	33,18	33,05
NM_011537	Tbx5	T-box 5	40,00	36,94	36,84	36,63	40,00	37,04
NM_009354	Tert	Telomerase reverse transcriptase	29,83	26,08	29,55	28,05	27,27	27,69
NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	26,03	23,23	25,63	26,93	27,94	27,04
NM_009368	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	25,03	36,80	26,43	24,28	24,30	24,31
NM_009382	Thy1	Thymus cell antigen 1, theta	22,23	23,71	23,11	33,87	35,40	34,42
NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	36,74	24,54	34,22	37,27	38,38	38,07
NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	24,74	26,57	23,76	22,62	22,36	23,38
NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	25,30	17,34	19,88	26,78	30,85	28,40
NM_011701	Vim	Vimentin	16,57	37,04	20,66	17,22	18,30	18,05
NM_011708	Vwf	Von Willebrand factor homolog	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009522	Wnt3a	Wingless-related MMTV integration site 3A	40,00	40,00	40,00	38,05	36,33	37,36
NM_009556	Zfp42	Zinc finger protein 42	40,00	25,78	35,78	40,00	36,93	38,73
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	24,89	22,36	24,69	25,52	28,17	27,27
NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	21,86	19,37	20,72	21,87	22,66	22,42
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	18,77	19,72	19,72	19,07	19,14	19,01
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18,80	17,71	17,95	20,03	20,05	18,92
NM_007393	Actb	Actin, beta	16,62	28,33	18,46	18,21	18,36	18,16
SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	25,76	27,04	25,44	26,46	29,80	27,53
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	25,83	27,11	25,74	26,21	30,70	27,36
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	25,76	27,09	25,97	26,28	30,44	27,54
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	18,51	19,23	19,03	18,96	23,73	21,07
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,06	18,97	18,88	18,93	24,43	20,78
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,08	40,00	19,50	19,31	26,18	20,63

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (JLp-MSC)			Ct értékek (JThy-MSC)		
			1. kís.	2. kís.	3. kís.	1. kís.	2. kís.	3. kís.
NM_011076	Abcb1a	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 1A	32,07	33,05	32,98	31,10	31,34	31,04
NM_009655	Alcam	Activated leukocyte cell adhesion molecule	30,15	29,76	29,67	32,22	32,16	32,30
NM_008486	Anpep	Alanyl (membrane) aminopeptidase	32,52	32,69	33,04	35,09	34,04	34,68
NM_009673	Anxa5	Annexin A5	21,15	21,32	21,62	21,96	21,83	21,83
NM_007540	Bdnf	Brain derived neurotrophic factor	29,87	29,57	29,59	28,08	28,30	28,07
NM_007541	Bglap1	Bone gamma carboxyglutamate protein 1	32,72	33,08	33,17	33,21	32,22	32,73
NM_007553	Bmp2	Bone morphogenetic protein 2	31,64	31,94	32,09	40,00	40,00	40,00
NM_007554	Bmp4	Bone morphogenetic protein 4	32,14	31,95	32,38	31,28	31,21	31,84
NM_007556	Bmp6	Bone morphogenetic protein 6	34,03	33,80	33,78	32,72	34,09	33,84
NM_007557	Bmp7	Bone morphogenetic protein 7	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009810	Casp3	Caspase 3	24,36	28,48	26,42	27,56	30,19	28,69
NM_009851	Cd44	CD44 antigen	24,82	23,75	24,57	23,56	25,09	24,26
NM_007742	Col1a1	Collagen, type I, alpha 1	21,75	21,01	21,12	22,53	21,98	22,53
NM_009969	Csf2	Colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	32,21	31,06	31,38	29,77	31,98	30,51
NM_009971	Csf3	Colony stimulating factor 3 (granulocyte)	39,73	40,00	39,66	33,87	36,61	34,56
NM_007614	Ctnnb1	Catenin (cadherin associated protein), beta 1	23,80	23,82	23,83	23,80	24,05	23,89
NM_010113	Egf	Epidermal growth factor	31,82	31,84	31,79	31,59	31,58	31,58
NM_007932	Eng	Endoglin	25,27	25,16	25,84	29,48	29,58	29,50
NM_001003817	ErbB2	V-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian)	26,70	26,50	26,56	26,87	26,71	26,79
NM_008002	Fgf10	Fibroblast growth factor 10	38,36	33,47	37,87	24,46	27,55	27,48
NM_008006	Fgf2	Fibroblast growth factor 2	28,66	28,66	28,66	25,36	25,65	25,43
NM_008051	Fut1	Fucosyltransferase 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010242	Fut4	Fucosyltransferase 4	40,00	40,00	40,00	37,16	37,53	37,24
XM_284144	Fzd9	Frizzled homolog 9 (Drosophila)	35,84	35,72	35,75	34,26	36,29	36,24
NM_011819	Gdf15	Growth differentiation factor 15	26,92	26,84	27,04	29,15	29,71	29,20
NM_008109	Gdf5	Growth differentiation factor 5	40,00	40,00	40,00	36,21	40,00	36,81
NM_013526	Gdf6	Growth differentiation factor 6	36,25	36,04	35,94	40,00	40,00	40,00
NM_013527	Gdf7	Growth differentiation factor 7	32,23	32,27	32,28	34,82	35,89	33,89
NM_025652	Gtf3a	General transcription factor III A	25,16	25,01	24,96	25,08	25,71	25,62
NM_026115	Hat1	Histone aminotransferase 1	25,63	25,28	25,26	24,83	25,91	25,47
NM_008228	Hdac1	Histone deacetylase 1	26,83	26,96	26,97	25,98	28,91	27,31
NM_010427	Hgf	Hepatocyte growth factor	22,27	22,81	22,89	22,38	23,06	22,73
NM_009327	Hnf1a	HNF1 homeobox A	40,00	40,00	40,00	36,04	35,94	35,99
NM_010493	Icam1	Intercellular adhesion molecule 1	40,00	40,00	40,00	35,01	36,51	35,63
NM_008337	Iifng	Interferon gamma	36,73	36,81	36,86	35,95	40,00	36,82
NM_010512	Igf1	Insulin-like growth factor 1	25,31	25,08	24,88	24,31	24,84	24,18
NM_010548	Il10	Interleukin 10	34,73	34,75	34,28	30,73	31,27	31,24
NM_008361	Il1b	Interleukin 1 beta	40,00	40,00	40,00	34,35	35,92	35,34
NM_031168	Il6	Interleukin 6	26,25	26,52	26,27	23,97	26,08	24,63
NM_008387	Ins2	Insulin II	39,82	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008397	Itga6	Integrin alpha 6	29,89	29,94	30,06	28,60	32,00	30,67
NM_008402	Itgav	Integrin alpha V	22,37	22,24	22,13	22,58	23,11	22,83
NM_021334	Itgax	Integrin alpha X	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010578	Itgb1	Integrin beta 1 (fibronectin receptor beta)	19,92	19,82	19,65	20,95	20,82	20,93
NM_013822	Jag1	Jagged 1	27,15	27,10	27,21	27,99	28,96	28,87
NM_010612	Kdr	Kinase insert domain protein receptor	31,80	31,02	30,93	31,86	32,06	31,84
NM_013598	Kitl	Kit ligand	29,53	29,24	29,04	26,30	27,99	26,89
NM_008501	Lif	Leukemia inhibitory factor	31,73	31,76	31,81	29,83	31,46	31,06
NM_023061	Mcam	Melanoma cell adhesion molecule	24,62	24,23	24,26	29,23	30,53	30,14
NM_008601	Mitf	Microphthalmia-associated transcription factor	27,38	27,81	27,83	27,68	27,53	27,63
NM_008610	Mmp2	Matrix metalloproteinase 2	22,13	22,51	23,26	26,90	27,51	27,74
NM_016701	Nes	Nestin	23,98	24,93	25,16	29,30	29,23	29,33

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (JLp-MSc)			Ct értékek (JThy-MSc)		
NM_033217	Ngfr	Nerve growth factor receptor (TNFR superfamily, member 16)	36,15	34,92	34,25	35,83	40,00	36,62
NM_008714	Notch1	Notch gene homolog 1 (Drosophila)	32,74	33,08	32,99	30,92	34,53	31,08
NM_011851	Nt5e	5' nucleotidase, ecto	28,44	31,40	30,21	29,75	30,14	30,83
NM_153561	Nudt6	Nudix (nucleoside diphosphate linked moiety X)-type motif 6	28,36	28,72	29,47	25,72	26,36	25,92
NM_020005	Kat2b	K(lysine) acetyltransferase 2B	24,81	25,59	25,21	24,13	25,15	25,15
NM_008809	Pdgfrb	Platelet derived growth factor receptor, beta polypeptide	23,42	22,67	23,16	23,49	23,36	23,42
NM_201406	Pigs	Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class S	27,11	25,12	25,05	25,84	25,73	25,79
NM_013633	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	30,64	30,85	30,73	30,16	29,95	30,13
NM_011146	Pparg	Peroxisome proliferator activated receptor gamma	27,93	26,90	26,92	26,33	28,09	26,21
NM_008935	Prom1	Prominin 1	37,17	36,86	36,14	40,00	40,00	40,00
NM_007982	Ptk2	PTK2 protein tyrosine kinase 2	24,43	25,47	25,80	26,24	26,19	26,31
NM_011210	Ptpnc	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_016802	Rhoa	Ras homolog gene family, member A	22,72	22,09	23,06	21,20	22,06	21,73
NM_009820	Runx2	Runt related transcription factor 2	29,63	29,86	30,62	27,86	29,48	29,23
NM_172773	Slc17a5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	26,42	27,23	27,72	26,50	26,97	26,62
NM_008540	Smad4	MAD homolog 4 (Drosophila)	25,62	26,12	26,04	23,88	26,89	24,82
NM_029438	Smurf1	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 1	24,83	25,13	25,06	25,06	25,01	25,02
NM_025481	Smurf2	SMAD specific E3 ubiquitin protein ligase 2	23,83	23,56	24,15	24,67	24,97	24,90
NM_011443	Sox2	SRY-box containing gene 2	40,00	40,00	38,92	40,00	40,00	40,00
NM_011448	Sox9	SRY-box containing gene 9	31,73	31,11	31,01	28,50	30,35	28,93
NM_011537	Tbx5	T-box 5	39,80	40,00	38,98	27,64	28,93	28,23
NM_009354	Tert	Telomerase reverse transcriptase	32,36	32,88	32,21	29,95	29,89	29,91
NM_011577	Tgfb1	Transforming growth factor, beta 1	28,42	27,82	27,14	24,07	27,57	27,24
NM_009368	Tgfb3	Transforming growth factor, beta 3	24,72	25,79	27,13	26,27	26,26	26,26
NM_009382	Thy1	Thymus cell antigen 1, theta	37,66	36,60	35,29	30,58	31,03	30,83
NM_013693	Tnf	Tumor necrosis factor	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011693	Vcam1	Vascular cell adhesion molecule 1	30,91	30,74	30,64	25,05	29,74	30,04
NM_009505	Vegfa	Vascular endothelial growth factor A	29,36	29,13	29,06	25,54	27,75	26,52
NM_011701	Vim	Vimentin	17,72	17,87	17,83	17,84	18,29	18,06
NM_011708	Vwf	Von Willebrand factor homolog	40,00	40,00	40,00	39,89	40,00	39,91
NM_009522	Wnt3a	Wingless-related MMTV integration site 3A	39,59	40,00	39,76	40,00	40,00	40,00
NM_009556	Zfp42	Zinc finger protein 42	39,14	40,00	40,00	40,00	40,00	39,67
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	26,82	26,82	26,82	25,36	27,33	27,33
NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	22,57	22,75	22,83	21,92	22,12	22,06
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	19,90	19,90	19,90	19,11	19,29	19,29
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18,75	18,75	18,75	19,91	19,91	19,91
NM_007393	Actb	Actin, beta	18,04	18,04	18,04	17,34	17,34	17,34
SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	29,95	29,95	29,95	26,84	29,37	29,37
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	30,10	30,10	30,10	27,15	29,55	29,55
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	30,22	30,22	30,22	26,50	29,07	29,07
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	23,68	23,68	23,68	19,78	22,08	22,08
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	23,77	23,77	23,77	19,81	23,14	23,14
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	26,07	26,07	26,07	19,99	23,47	23,47

* Az array 84 primer párt tartalmaz, melyek a gyártó leírása alapján a következő csoportokba sorolhatók: ösiség markerek, MSC-specifikus markerek, egyéb, MSC-hez köthető molekulák, és olyanok, melyek részt vesznek az csont-, zsír-, porc-, izomképződésben (osteogenesis, adipogenesis, chondrogenesis, myogenesis) és az inak fejlődésében. Az array tartalmaz továbbá egy genomális DNS szennyeződés kontrollt (H06), 3 reverz transzkripció kontrollt (H07-H09) és 3 pozitív PCR kontroll lyukat is (H10-12) (SA Biosciences, <http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAMM-082A>).

2. Kiegészítő táblázat: A Mouse Homeobox (HOX) Genes PCR Array génjei.*

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (JCsv-MSC)			Ct értékek (Csv-MSC)		
			1. kís.	2. kís.	3. kís.	1. kís.	2. kís.	3. kís.
NM_172553	Alx1	ALX homeobox 1	38,30	40,00	38,56	28,23	28,51	28,64
NM_007441	Alx3	Aristaless-like homeobox 3	38,07	38,72	38,43	37,43	40,00	39,62
NM_007442	Alx4	Aristaless-like homeobox 4	37,58	35,68	37,46	32,79	33,67	33,54
NM_007492	Arx	Aristaless related homeobox	40,00	40,00	40,00	38,33	40,00	40,00
NM_007526	Barx1	BarH-like homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009880	Cdx1	Caudal type homeo box 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_007673	Cdx2	Caudal type homeo box 2	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_007674	Cdx4	Caudal type homeo box 4	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009986	Cux1	Cut-like homeobox 1	24,90	24,92	24,92	24,55	24,59	24,57
NM_010053	Dlx1	Distal-less homeobox 1	28,80	28,73	28,83	29,85	29,66	29,76
NM_010054	Dlx2	Distal-less homeobox 2	30,49	30,77	30,46	30,11	30,11	30,12
NM_010055	Dlx3	Distal-less homeobox 3	26,93	26,78	26,87	36,02	35,63	35,78
NM_007867	Dlx4	Distal-less homeobox 4	29,44	29,64	29,53	30,20	30,21	30,21
NM_198854	Dlx5	Distal-less homeobox 5	38,97	36,03	37,33	35,90	37,03	36,87
XM_355743	Dlx6	Distal-less homeobox 6	34,93	33,80	33,94	30,59	30,58	30,58
NM_130865	Dmbx1	Diencephalon/mesencephalon homeobox 1	40,00	40,00	40,00	36,83	38,38	36,87
NM_010131	Emx1	Empty spiracles homolog 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010132	Emx2	Empty spiracles homolog 2 (Drosophila)	27,20	27,24	27,21	25,99	26,01	26,02
NM_010133	En1	Engrailed 1	36,92	40,00	40,00	30,32	30,63	30,36
NM_010134	En2	Engrailed 2	40,00	40,00	40,00	35,90	40,00	40,00
NM_010420	Hesx1	Homeo box gene expressed in ES cells	33,57	32,93	33,54	35,28	34,95	35,11
NM_008245	Hhex	Hematopoietically expressed homeobox	32,02	31,61	31,81	27,02	27,11	27,08
NM_008250	Hlx	H2.0-like homeobox	29,97	29,90	29,94	27,48	27,30	27,35
NM_175606	Hopx	HOP homeobox	40,00	40,00	40,00	35,25	38,76	37,62
NM_010449	Hoxa1	Homeo box A1	30,08	29,80	29,93	29,33	29,56	29,46
NM_010455	Hoxa7	Homeo box A7	26,61	26,72	26,63	27,27	27,24	27,27
NM_010456	Hoxa9	Homeo box A9	27,61	27,45	27,56	27,30	27,80	27,91
NM_008266	Hoxb1	Homeo box B1	40,00	40,00	40,00	35,82	36,05	36,12
NM_134032	Hoxb2	Homeo box B2	32,06	31,77	31,85	30,21	29,17	29,13
NM_010458	Hoxb3	Homeo box B3	30,93	31,30	31,36	29,03	29,59	29,61
NM_010459	Hoxb4	Homeo box B4	30,18	30,37	30,36	28,95	28,19	28,37
NM_010460	Hoxb7	Homeo box B7	37,01	35,96	36,79	40,00	29,31	28,81
NM_010461	Hoxb8	Homeo box B8	36,18	40,00	37,89	29,70	30,27	30,35
NM_008270	Hoxb9	Homeo box B9	40,00	40,00	40,00	27,00	27,14	27,16
NM_010462	Hoxc10	Homeo box C10	28,20	27,66	27,96	26,34	26,84	26,73
NM_001024842	Hoxc11	Homeo box C11	33,45	32,81	33,46	28,16	28,51	28,36
NM_010463	Hoxc12	Homeo box C12	27,67	27,19	27,35	27,90	28,06	28,12
NM_010464	Hoxc13	Homeo box C13	25,56	25,57	25,57	26,15	26,56	26,27
NM_010465	Hoxc6	Homeo box C6	24,58	24,65	24,62	24,17	24,30	24,14
NM_010466	Hoxc8	Homeo box C8	28,94	28,94	28,92	28,02	28,57	28,36
NM_008272	Hoxc9	Homeo box C9	26,86	26,69	26,78	25,77	26,05	25,92
NM_010467	Hoxd1	Homeo box D1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008274	Hoxd12	Homeo box D12	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008275	Hoxd13	Homeo box D13	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010468	Hoxd3	Homeo box D3	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010469	Hoxd4	Homeo box D4	36,82	36,82	36,81	40,00	40,00	40,00
NM_008276	Hoxd8	Homeo box D8	28,72	28,56	28,56	40,00	36,69	38,27
NM_013555	Hoxd9	Homeo box D9	38,23	38,34	38,31	40,00	40,00	40,00
NM_021459	Isl1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	33,00	33,44	33,23	37,86	40,00	40,00
NM_027397	Isl2	Insulin related protein 2 (islet 2)	33,72	33,10	33,64	30,57	31,62	31,15
NM_010691	Lbx1	Ladybird homeobox homolog 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010692	Lbx2	Ladybird homeobox homolog 2 (Drosophila)	32,68	32,62	32,67	31,42	32,13	31,83
NM_008498	Lhx1	LIM homeobox protein 1	40,00	40,00	40,00	40,00	36,17	38,37
NM_033652	Lmx1a	LIM homeobox transcription factor 1 alpha	40,00	40,00	40,00	35,24	35,28	35,27
NM_010725	Lmx1b	LIM homeobox transcription factor 1 beta	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00

GeneBank	Symbol	Description	Ct values (JBM-MSC)			Ct values (ABM-MSC)		
NM_010789	Meis1	Meis homeobox 1	30,57	29,44	29,67	29,82	30,89	30,28
NM_010791	Meox1	Mesenchyme homeobox 1	31,56	32,14	32,06	27,81	27,95	27,88
NM_013729	Mix1	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)	37,17	36,93	36,99	32,67	33,06	33,20
NM_177595	Mkx	Mohawk homeobox	27,29	27,16	27,16	26,34	26,59	26,42
NM_010835	Msx1	Homeobox, msh-like 1	31,14	30,32	31,06	29,25	29,63	29,24
NM_013601	Msx2	Homeobox, msh-like 2	28,19	28,01	28,13	29,10	29,27	29,18
NM_010921	Nkx3-1	NK-3 transcription factor, locus 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	39,42	40,00	40,00
NM_011021	Otp	Orthopedia homolog (Drosophila)	34,02	33,95	33,98	33,70	34,01	33,83
NM_011023	Otx1	Orthodenticle homolog 1 (Drosophila)	35,66	36,11	35,76	34,24	34,50	34,62
NM_144841	Otx2	Orthodenticle homolog 2 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008781	Pax3	Paired box gene 3	40,00	40,00	40,00	27,63	27,96	27,53
NM_008814	Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008888	Phox2b	Paired-like homeobox 2b	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011097	Pitx1	Paired-like homeodomain transcription factor 1	27,48	27,24	27,28	27,50	27,89	27,62
NM_011098	Pitx2	Paired-like homeodomain transcription factor 2	38,72	40,00	40,00	36,83	40,00	40,00
NM_008852	Pitx3	Paired-like homeodomain transcription factor 3	40,00	40,00	40,00	36,49	40,00	40,00
NM_013633	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	29,21	29,43	29,25	29,67	29,91	29,73
NM_008936	Prop1	Paired like homeodomain factor 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008937	Prox1	Prospero-related homeobox 1	37,62	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_013665	Shox2	Short stature homeobox 2	26,60	26,46	26,62	24,49	24,57	24,36
NM_009189	Six1	Sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)	27,04	26,90	26,97	25,26	25,43	25,53
NM_011380	Six2	Sine oculis-related homeobox 2 homolog (Drosophila)	37,05	36,85	36,96	40,00	40,00	40,00
NM_011381	Six3	Sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011382	Six4	Sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	26,12	26,04	26,11	25,83	25,93	25,84
NM_011384	Six6	Sine oculis-related homeobox 6 homolog (Drosophila)	40,00	34,52	35,14	34,71	34,62	34,67
NM_021901	Tlx1	T-cell leukemia, homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009501	Vax1	Ventral anterior homeobox containing gene 1	37,45	40,00	40,00	37,38	40,00	39,72
NM_011912	Vax2	Ventral anterior homeobox containing gene 2	34,87	36,25	36,03	34,54	34,98	34,82
NM_054068	Vsx1	Visual system homeobox 1 homolog (zebrafish)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	27,91	25,67	27,64	22,98	23,63	23,24
NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	21,87	21,91	21,88	21,67	21,83	21,74
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	19,27	19,31	19,29	19,58	19,79	19,71
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	19,63	19,66	19,64	18,64	18,68	18,67
NM_007393	Actb	Actin, beta	17,44	17,29	17,34	16,96	17,16	17,07
SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	24,77	24,65	24,52	24,74	24,90	24,81
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	24,73	24,52	24,65	24,61	24,77	24,72
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	24,79	24,57	24,61	24,63	24,87	24,62
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,83	19,43	19,78	19,14	19,49	19,26
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,67	19,43	19,76	18,89	19,48	19,27
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,82	19,44	19,80	18,67	19,80	19,72

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (Zs-MS)			Ct értékek (JAo-MS)		
			1. kís.	2. kís.	3. kís.	1. kís.	2. kís.	3. kís.
NM_172553	Alx1	ALX homeobox 1	40,00	37,57	38,92	40,00	40,00	40,00
NM_007441	Alx3	Aristaless-like homeobox 3	37,68	36,48	36,25	37,71	36,85	37,32
NM_007442	Alx4	Aristaless-like homeobox 4	36,71	35,54	35,89	35,72	35,90	35,83
NM_007492	Arx	Aristaless related homeobox	40,00	40,00	40,00	36,59	36,74	36,64
NM_007526	Barx1	BarH-like homeobox 1	35,87	36,86	36,36	40,00	40,00	40,00
NM_009880	Cdx1	Caudal type homeo box 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_007673	Cdx2	Caudal type homeo box 2	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_007674	Cdx4	Caudal type homeo box 4	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009986	Cux1	Cut-like homeobox 1	23,97	24,02	23,99	24,23	24,21	24,22
NM_010053	Dlx1	Distal-less homeobox 1	27,26	27,19	27,22	28,88	28,80	28,89
NM_010054	Dlx2	Distal-less homeobox 2	26,87	26,72	26,84	28,74	28,75	28,75
NM_010055	Dlx3	Distal-less homeobox 3	29,50	29,00	29,42	28,29	27,58	27,38
NM_007867	Dlx4	Distal-less homeobox 4	31,31	31,09	31,18	24,66	24,34	24,62
NM_198854	Dlx5	Distal-less homeobox 5	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
XM_355743	Dlx6	Distal-less homeobox 6	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_130865	Dmbx1	Diencephalon/mesencephalon homeobox 1	40,00	40,00	40,00	38,61	40,00	40,00
NM_010131	Emx1	Empty spiracles homolog 1 (Drosophila)	40,00	39,00	39,58	40,00	38,77	39,62
NM_010132	Emx2	Empty spiracles homolog 2 (Drosophila)	26,27	26,15	26,18	26,75	26,61	26,73
NM_010133	En1	Engrailed 1	35,32	32,05	32,68	34,46	33,96	34,17
NM_010134	En2	Engrailed 2	39,13	35,05	37,17	29,13	28,75	28,83
NM_010420	Hesx1	Homeo box gene expressed in ES cells	40,00	40,00	40,00	37,31	40,00	40,00
NM_008245	Hhex	Hematopoietically expressed homeobox	28,88	28,28	28,48	28,70	28,45	28,85
NM_008250	Hlix	H2.0-like homeobox	30,53	30,05	30,24	31,51	31,95	31,84
NM_175606	Hopx	HOP homeobox	40,00	37,83	38,73	35,86	33,65	35,37
NM_010449	Hoxa1	Homeo box A1	28,68	28,06	28,16	30,34	30,07	30,28
NM_010455	Hoxa7	Homeo box A7	25,71	25,60	25,66	27,90	26,98	27,37
NM_010456	Hoxa9	Homeo box A9	33,99	30,77	31,37	33,48	32,59	32,84
NM_008266	Hoxb1	Homeo box B1	40,00	37,63	38,78	40,00	36,92	38,37
NM_134032	Hoxb2	Homeo box B2	32,15	28,69	30,73	30,10	29,61	29,95
NM_010458	Hoxb3	Homeo box B3	31,36	28,52	28,78	30,70	30,32	30,65
NM_010459	Hoxb4	Homeo box B4	29,65	26,97	28,54	28,90	28,81	28,87
NM_010460	Hoxb7	Homeo box B7	28,01	24,94	27,67	29,53	29,46	29,52
NM_010461	Hoxb8	Homeo box B8	30,50	28,22	29,76	31,72	31,71	31,71
NM_008270	Hoxb9	Homeo box B9	29,08	27,12	28,32	32,09	32,09	32,07
NM_010462	Hoxc10	Homeo box C10	30,49	28,87	29,16	34,18	33,88	33,89
NM_001024842	Hoxc11	Homeo box C11	33,61	32,46	32,91	35,80	35,80	35,78
NM_010463	Hoxc12	Homeo box C12	29,75	27,68	28,89	32,92	32,84	32,87
NM_010464	Hoxc13	Homeo box C13	27,29	25,38	26,53	26,15	26,20	26,16
NM_010465	Hoxc6	Homeo box C6	23,80	23,30	23,71	29,27	29,15	29,18
NM_010466	Hoxc8	Homeo box C8	29,29	25,60	28,12	37,01	34,63	36,69
NM_008272	Hoxc9	Homeo box C9	27,48	25,71	27,78	32,78	32,20	32,42
NM_010467	Hoxd1	Homeo box D1	37,77	36,27	36,45	35,25	37,18	36,73
NM_008274	Hoxd12	Homeo box D12	35,47	36,79	36,27	40,00	40,00	40,00
NM_008275	Hoxd13	Homeo box D13	40,00	36,24	37,82	40,00	38,14	38,46
NM_010468	Hoxd3	Homeo box D3	40,00	32,98	38,92	32,32	32,36	32,33
NM_010469	Hoxd4	Homeo box D4	27,76	27,88	27,77	27,99	28,06	28,07
NM_008276	Hoxd8	Homeo box D8	24,66	24,03	24,41	24,07	24,70	24,25
NM_013555	Hoxd9	Homeo box D9	39,55	33,58	34,62	35,06	34,63	34,36
NM_021459	Isl1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	33,50	34,04	33,82	40,00	36,50	36,98
NM_027397	Isl2	Insulin related protein 2 (islet 2)	35,69	33,06	33,81	33,70	33,16	33,37
NM_010691	Lbx1	Ladybird homeobox homolog 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010692	Lbx2	Ladybird homeobox homolog 2 (Drosophila)	33,72	32,90	33,10	32,79	32,79	32,80
NM_008498	Lhx1	LIM homeobox protein 1	30,59	29,82	29,89	32,79	31,66	31,72
NM_033652	Lmx1a	LIM homeobox transcription factor 1 alpha	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010725	Lmx1b	LIM homeobox transcription factor 1 beta	33,87	33,85	33,88	34,94	35,53	35,15

GeneBank	Symbol	Description	Ct értékek (Zs-MSc)			Ct values (Jao-MSc)		
NM_010789	Meis1	Meis homeobox 1	33,97	29,32	31,43	29,86	30,15	30,02
NM_010791	Meox1	Mesenchyme homeobox 1	40,00	36,85	38,72	36,87	40,00	40,00
NM_013729	Mix1	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)	35,77	32,73	34,22	36,89	37,97	37,23
NM_177595	Mkx	Mohawk homeobox	27,61	26,97	27,17	26,68	26,80	26,72
NM_010835	Msx1	Homeobox, msh-like 1	31,58	27,81	29,17	29,84	29,74	29,83
NM_013601	Msx2	Homeobox, msh-like 2	30,06	29,24	29,61	40,00	40,00	40,00
NM_010921	Nkx3-1	NK-3 transcription factor, locus 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011021	Otp	Orthopedia homolog (Drosophila)	34,64	33,79	33,92	33,87	33,78	33,83
NM_011023	Otx1	Orthodenticle homolog 1 (Drosophila)	32,52	32,07	32,41	33,92	33,67	33,69
NM_144841	Otx2	Orthodenticle homolog 2 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008781	Pax3	Paired box gene 3	38,10	36,60	37,92	27,13	27,14	27,14
NM_008814	Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008888	Phox2b	Paired-like homeobox 2b	40,00	36,87	38,62	37,29	40,00	39,28
NM_011097	Pitx1	Paired-like homeodomain transcription factor 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011098	Pitx2	Paired-like homeodomain transcription factor 2	36,31	30,96	31,73	38,27	39,33	39,31
NM_008852	Pitx3	Paired-like homeodomain transcription factor 3	40,00	40,00	40,00	36,86	35,68	35,71
NM_013633	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	30,08	29,87	29,89	30,53	30,31	30,51
NM_008936	Prop1	Paired like homeodomain factor 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008937	Prox1	Prospero-related homeobox 1	30,57	29,99	30,13	30,50	30,26	30,37
NM_013665	Shox2	Short stature homeobox 2	32,68	31,60	31,72	30,69	30,99	30,72
NM_009189	Six1	Sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)	27,79	27,17	27,77	30,34	30,73	30,38
NM_011380	Six2	Sine oculis-related homeobox 2 homolog (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011381	Six3	Sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila)	40,00	35,55	38,14	40,00	40,00	40,00
NM_011382	Six4	Sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	26,68	25,03	26,52	26,65	26,58	26,63
NM_011384	Six6	Sine oculis-related homeobox 6 homolog (Drosophila)	39,09	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_021901	Tlx1	T-cell leukemia, homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	36,54	39,39
NM_009501	Vax1	Ventral anterior homeobox containing gene 1	40,00	37,60	39,62	40,00	39,95	40,00
NM_011912	Vax2	Ventral anterior homeobox containing gene 2	31,37	31,30	31,30	34,74	35,33	35,37
NM_054068	Vsx1	Visual system homeobox 1 homolog (zebrafish)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	27,61	24,85	26,61	25,91	25,73	25,75
NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	22,30	21,75	22,15	22,06	21,91	21,95
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	19,01	18,61	18,81	19,32	19,13	19,36
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18,77	18,27	18,35	20,39	20,34	20,37
NM_007393	Actb	Actin, beta	16,48	15,82	16,24	18,06	17,92	18,42
SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	40,00	40,00	40,00	40,00	37,47	40,00
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	27,15	24,56	26,41	24,88	24,52	24,63
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	27,08	24,60	26,15	24,74	24,85	24,72
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	28,20	24,49	28,15	24,74	24,74	24,73
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	23,03	19,21	20,26	19,45	19,60	19,57
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	23,60	19,30	20,27	19,23	19,71	19,74
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	24,88	19,48	20,37	18,77	19,68	19,69

GeneBank	Rövidítés	Elnevezés	Ct értékek (JLp-MSC)			Ct értékek (JThy-MSC)		
			1. kís.	2. kís.	3. kís.	1. kís.	2. kís.	3. kís.
NM_172553	Alx1	ALX homeobox 1	40,00	40,00	40,00	25,56	25,43	25,54
NM_007441	Alx3	Aristaless-like homeobox 3	36,70	37,98	37,06	33,64	33,55	33,62
NM_007442	Alx4	Aristaless-like homeobox 4	34,91	38,33	36,17	33,80	34,26	34,17
NM_007492	Arx	Aristaless related homeobox	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_007526	Barx1	BarH-like homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009880	Cdx1	Caudal type homeo box 1	40,00	40,00	40,00	38,18	38,25	38,29
NM_007673	Cdx2	Caudal type homeo box 2	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_007674	Cdx4	Caudal type homeo box 4	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_009986	Cux1	Cut-like homeobox 1	24,13	24,32	24,21	24,62	24,72	24,63
NM_010053	Dlx1	Distal-less homeobox 1	28,89	28,86	28,88	28,86	28,80	28,83
NM_010054	Dlx2	Distal-less homeobox 2	29,89	30,52	30,03	29,34	29,48	29,37
NM_010055	Dlx3	Distal-less homeobox 3	36,81	35,33	35,82	37,89	37,79	37,83
NM_007867	Dlx4	Distal-less homeobox 4	40,00	37,73	38,61	32,77	32,74	32,84
NM_198854	Dlx5	Distal-less homeobox 5	40,00	40,00	40,00	36,58	40,00	38,82
XM_355743	Dlx6	Distal-less homeobox 6	40,00	40,00	40,00	37,25	35,35	35,37
NM_130865	Dmbx1	Diencephalon/mesencephalon homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010131	Emx1	Empty spiracles homolog 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010132	Emx2	Empty spiracles homolog 2 (Drosophila)	30,67	31,16	31,17	25,36	25,36	25,37
NM_010133	En1	Engrailed 1	28,66	30,22	30,03	29,30	28,73	28,62
NM_010134	En2	Engrailed 2	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010420	Hesx1	Homeo box gene expressed in ES cells	40,00	39,13	39,78	38,40	40,00	40,00
NM_008245	Hhex	Hematopoietically expressed homeobox	30,51	30,66	30,56	33,68	34,04	33,74
NM_008250	Hlx	H2.0-like homeobox	28,69	28,87	28,72	29,47	29,88	29,88
NM_175606	Hopx	HOP homeobox	40,00	40,00	40,00	40,00	38,09	38,93
NM_010449	Hoxa1	Homeo box A1	29,27	29,49	29,28	29,65	29,79	29,48
NM_010455	Hoxa7	Homeo box A7	29,93	30,20	29,73	24,69	24,79	24,74
NM_010456	Hoxa9	Homeo box A9	40,00	40,00	40,00	28,63	28,15	28,42
NM_008266	Hoxb1	Homeo box B1	40,00	39,40	39,68	34,29	34,31	34,32
NM_134032	Hoxb2	Homeo box B2	27,20	28,96	27,82	27,85	27,17	27,83
NM_010458	Hoxb3	Homeo box B3	27,96	29,22	28,94	28,25	27,83	27,75
NM_010459	Hoxb4	Homeo box B4	26,85	27,88	27,76	26,77	26,56	26,74
NM_010460	Hoxb7	Homeo box B7	26,06	27,60	26,48	25,29	24,73	24,38
NM_010461	Hoxb8	Homeo box B8	27,18	28,11	28,06	26,66	26,64	26,62
NM_008270	Hoxb9	Homeo box B9	24,89	25,66	25,34	27,03	26,65	26,67
NM_010462	Hoxc10	Homeo box C10	36,59	37,04	36,56	34,28	33,72	33,93
NM_001024842	Hoxc11	Homeo box C11	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010463	Hoxc12	Homeo box C12	30,76	31,95	31,14	35,30	34,58	34,84
NM_010464	Hoxc13	Homeo box C13	26,74	27,58	27,35	29,30	29,18	29,29
NM_010465	Hoxc6	Homeo box C6	34,91	35,22	35,03	24,16	24,07	24,17
NM_010466	Hoxc8	Homeo box C8	40,00	40,00	40,00	28,00	27,55	27,73
NM_008272	Hoxc9	Homeo box C9	40,00	39,58	39,67	26,89	26,59	26,43
NM_010467	Hoxd1	Homeo box D1	40,00	40,00	40,00	40,00	38,13	38,94
NM_008274	Hoxd12	Homeo box D12	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008275	Hoxd13	Homeo box D13	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010468	Hoxd3	Homeo box D3	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010469	Hoxd4	Homeo box D4	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008276	Hoxd8	Homeo box D8	35,50	33,76	34,97	28,50	28,67	28,48
NM_013555	Hoxd9	Homeo box D9	40,00	40,00	40,00	38,86	40,00	40,00
NM_021459	Isl1	ISL1 transcription factor, LIM/homeodomain	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_027397	Isl2	Insulin related protein 2 (islet 2)	29,82	31,03	30,36	33,63	34,09	33,73
NM_010691	Lbx1	Ladybird homeobox homolog 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010692	Lbx2	Ladybird homeobox homolog 2 (Drosophila)	30,90	31,01	30,96	31,03	32,06	31,18
NM_008498	Lhx1	LIM homeobox protein 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_033652	Lmx1a	LIM homeobox transcription factor 1 alpha	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010725	Lmx1b	LIM homeobox transcription factor 1 beta	36,39	36,61	36,56	36,49	40,00	40,00

GeneBank	Symbol	Description	Ct values (JSpl-MS)			Ct values (JThy-MS)		
NM_010789	Meis1	Meis homeobox 1	28,54	31,25	30,58	28,46	27,71	28,25
NM_010791	Meox1	Mesenchyme homeobox 1	37,11	34,93	36,84	31,52	31,84	31,57
NM_013729	Mix1	Mix1 homeobox-like 1 (Xenopus laevis)	37,90	38,74	38,45	36,70	36,54	36,63
NM_177595	Mkx	Mohawk homeobox	27,04	27,21	27,05	26,90	26,94	26,90
NM_010835	Msx1	Homeobox, msh-like 1	30,31	31,49	31,35	34,44	34,67	34,36
NM_013601	Msx2	Homeobox, msh-like 2	25,81	26,07	25,78	29,17	29,46	29,38
NM_010921	Nkx3-1	NK-3 transcription factor, locus 1 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011021	Otp	Orthopedia homolog (Drosophila)	33,79	33,89	33,73	34,21	33,54	33,64
NM_011023	Otx1	Orthodenticle homolog 1 (Drosophila)	34,11	33,81	33,94	35,71	35,43	35,48
NM_144841	Otx2	Orthodenticle homolog 2 (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008781	Pax3	Paired box gene 3	27,10	27,68	27,48	33,27	33,33	33,32
NM_008814	Pdx1	Pancreatic and duodenal homeobox 1	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_008888	Phox2b	Paired-like homeobox 2b	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011097	Pitx1	Paired-like homeodomain transcription factor 1	40,00	40,00	40,00	37,10	40,00	40,00
NM_011098	Pitx2	Paired-like homeodomain transcription factor 2	34,82	35,94	35,56	29,97	29,55	29,84
NM_008852	Pitx3	Paired-like homeodomain transcription factor 3	40,00	40,00	40,00	36,56	40,00	38,83
NM_013633	Pou5f1	POU domain, class 5, transcription factor 1	30,05	30,03	30,05	29,15	29,21	29,18
NM_008936	Prop1	Paired like homeodomain factor 1	40,00	40,00	40,00	40,00	38,31	38,93
NM_008937	Prox1	Prospero-related homeobox 1	28,66	28,67	28,67	36,28	34,05	36,37
NM_013665	Shox2	Short stature homeobox 2	27,69	28,09	27,73	28,28	28,07	28,27
NM_009189	Six1	Sine oculis-related homeobox 1 homolog (Drosophila)	26,82	26,98	26,84	25,85	25,90	25,86
NM_011380	Six2	Sine oculis-related homeobox 2 homolog (Drosophila)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011381	Six3	Sine oculis-related homeobox 3 homolog (Drosophila)	38,78	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_011382	Six4	Sine oculis-related homeobox 4 homolog (Drosophila)	25,74	26,26	25,74	25,24	25,26	25,24
NM_011384	Six6	Sine oculis-related homeobox 6 homolog (Drosophila)	40,00	36,82	36,94	36,05	35,63	35,37
NM_021901	Tlx1	T-cell leukemia, homeobox 1	25,34	25,77	25,46	40,00	40,00	40,00
NM_009501	Vax1	Ventral anterior homeobox containing gene 1	40,00	40,00	40,00	38,18	40,00	40,00
NM_011912	Vax2	Ventral anterior homeobox containing gene 2	34,65	34,57	34,63	34,05	36,63	36,36
NM_054068	Vsx1	Visual system homeobox 1 homolog (zebrafish)	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
NM_010368	Gusb	Glucuronidase, beta	25,25	26,22	26,24	25,84	25,55	25,73
NM_013556	Hprt1	Hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase 1	22,11	22,35	22,24	21,97	21,87	21,93
NM_008302	Hsp90ab1	Heat shock protein 90 alpha (cytosolic), class B member 1	19,79	19,77	19,79	19,09	19,06	19,08
NM_008084	Gapdh	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	18,84	18,93	18,85	19,92	19,99	29,93
NM_007393	Actb	Actin, beta	17,31	17,48	17,35	17,01	17,04	17,03
SA_00106	MGDC	Mouse Genomic DNA Contamination	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00	40,00
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	24,69	25,61	25,23	25,29	24,80	24,78
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	24,68	25,05	25,28	24,63	24,61	24,69
SA_00104	RTC	Reverse Transcription Control	24,67	25,21	25,19	24,82	24,66	24,64
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,51	20,94	19,67	19,74	19,33	19,53
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	19,63	20,74	19,76	19,90	19,33	19,55
SA_00103	PPC	Positive PCR Control	20,51	20,96	19,69	19,90	19,84	19,83

*Az array 84 primer párt tartalmaz, melyek mindegyike egy-egy homeodomén tartalmú transzkripció faktor kódol. Ez utóbbiak olyan folyamatokban szerepelnek, mint a szervfejlődés, mintázatkialakítás, ectoderma és endoderma kialakulása, idegrendszer fejlődése, vázrendszer-, izom- és szívfejlődés. Ezen kívül az arrayvel olyan HOX gének is vizsgálhatók, melyek a sejtek alapvető működésében szerepelnek, mint például a többféle sejttípus irányába történő differenciáció. Az array tartalmaz továbbá egy genomiális DNS szennyeződés kontrollt (H06), 3 reverz transzkripció kontrollt (H07-H09) és 3 pozitív PCR kontrollt lyukat is (H10-12) (SA Biosciences, <http://www.sabiosciences.com/genetable.php?pcatn=PAMM-082A>).

3. kiegészítő táblázat: A kvantitatív RT-PCR mérésekhez használt primerek katalógusszámai.

GAPDH	Applied Biosystems	Mm99999915-g1
Nanog	Applied Biosystems	Mm02384862_g1
Pou5f1 (Oct4)	Applied Biosystems	Mm00658129_gH
Zfp42 (Rex1)	Applied Biosystems	Mm01194090_g1
Brachyury (T)	Applied Biosystems	Mm01318252_m1
Klf4	Applied Biosystems	Mm00516105_g1
Acta2	Applied Biosystems	Mm01204962_gH
Gata4	Applied Biosystems	Mm00484689_m1
Gata6	Applied Biosystems	Mm00802636_m1
Nkx2.5	Applied Biosystems	Mm00657783_m1