

# Az extracelluláris vezikulák és membrán nanocsövek szerepe a mezenchimális őssejtek és T limfociták közötti transzportfolyamatokban

Doktori értekezés tézisei

**Matula Zsolt**

Semmelweis Egyetem  
Patológiai tudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Urbán Veronika, Ph.D., főiskolai tanár  
Dr. Tátrai Péter, Ph.D., szenior kutató

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy György, az MTA doktora, egyetemi docens  
Dr. Molnár Kinga, Ph.D, egyetemi adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Nagy Károly, Ph.D., egyetemi tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens  
Dr. László Lajos, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2017

## Bevezetés

A mezenchimális őssejtek (MSC-k) olyan szöveti eredetű ős- vagy elődsejtek, melyek már részben elköteleződtek valamilyen szövettípusra jellemző fejlődési irányba, tehát csak bizonyos sejtípusok létrehozására képesek. Természetesen aszimmetrikus osztódással önmegújításra is képesek, tehát a meghatározott funkcióra specializált utódsejt létrehozásán kívül képesek egy differenciálatlan, még egyértelműen őssejtnek tekinthető utódsejt létrehozására is. A mezenchimális őssejtek elsősorban a mezodermális eredetű szövetekre jellemző sejtípusok létrehozására alkalmasak, tehát csont, porc, zsírszövet, simaizom, inak létrehozására képesek differenciációjuk során [1]. Egyes források szerint speciális tenyésztési körülmények között képesek ectodermális és endodermális irányú differenciációra is, bár ezen képességük, amelyet unortodox plaszticitásnak is szokás nevezni, erősen vitatott [2]. Manapság már széles körűen elfogadottá vált az a nézet, miszerint a mezenchimális őssejtek szinte valamennyi szervből és szövetből izolálható kötőszöveti őssejteknek tekinthetők [3]. A csontvelőn kívül nagyon könnyen hozzáférhető forrásuk a zsírszövet, a köldökzsínór ún. Wharton-kocsonyája, de mindemellett a timusból, májból, tüdőből, veséből, lépből, izomszövetből, és még számos egyéb szövetből is – aortából vagy vena cava falából, sőt egyes források szerint agyszövetből is – éppúgy kinyerhetőek [4,5].

Kiemelkedő gyulladásgátló és immunszuppresszív aktivitásuk folytán a mezenchimális őssejtek használata ígéretes terápiás lehetőségeket rejt magában [6]. Az MSC-k számos olyan rendellenesség esetén sikerrel alkalmazhatóak, melyek kiváltó oka a diszregulált és túlzott mértékű immunválasz. Ilyen rendellenességek például a graft versus host betegség (graft versus host disease, GVHD), az autoimmun Chron betegség, szklerózis multiplex, oszteoarthritis, 1-es típusú diabétesz mellitusz, szisztémás lupusz erithematosus (SLE), vagy éppen a kísérletes autoimmun enkefalomyelitisz [7-10]. Gyakorlatilag a természetes és adaptív immunrendszer összes sejtípusának működésére képesek gátló hatást kifejteni [11-13].

Kutatásaim szempontjából fontos kiemelni, hogy a mezenchimális őssejtek erőteljes gátló hatást gyakorolnak a T limfocitákra is: redukálják az aktivált T-sejtek osztódását, elősegítik a regulátor T-sejtek képződését, valamint megváltoztatják a különböző T-sejt populációk citokin profilját [14,15]. Amíg az MSC-k által termelt citokineken és szolubilis faktorokon alapuló gátló hatásuk, valamint a ko-kultúrákban tapasztalható – részben a közvetlen sejt-sejt kapcsolatoknak is köszönhető – erőteljes immunszuppresszív aktivitásuk jól ismert, az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák (EV-k) szerepe a T limfociták funkcionális gátlásában még kevésbé tisztázott. Mostanáig mindössze néhány tanulmány született, amelyekben a T

limfocitákra gyakorolt immunmoduláló hatásukat vizsgálták, viszont az eredmények meglehetősen ellentmondásosnak bizonyultak azzal kapcsolatban, hogy az EV-k hatékonysága *in vitro* kísérletek során megközelíti-e azt a szintet, amelyet az MSC-k közvetlen jelenléte biztosít [16-19].

Az elmúlt időszakban az extracelluláris vezikulák szerepe a legkülönbözőbb membrán proteinek és citoplazmatikus komponensek irányított sejtközötti transzportjában egy nagyon intenzíven kutatott tudományterületté nőtte ki magát [20,21]. Az extracelluláris vezikulák a sejtek közötti komplex információ-átvitelben töltenek be nagyon fontos szerepet, hiszen képesek a különböző vegyületek, fehérjék nagy koncentrációban történő célba juttatására, és egyben védelmet nyújtanak számos molekula – különböző ribonukleinsavak, miRNS, mRNS – számára a degradáció ellen [22]. Nagyon fontos szerepet töltenek be a donor sejt funkciójának támogatásában, illetve térbeli kiterjesztésében, mint például az antigénbemutatás MHCII-antigén komplex szállításával, vagy a tumorsejtek terjedésének elősegítése. A legnagyobb tudományos érdeklődés a mikrovezikulákat (MV) és az exoszómákat (EXO) övezi. E két EV populáció közötti különbség elsősorban a méretbeli különbségükből adódik, de a vezikulaképzés mechanizmusa is teljesen eltérő: az exoszómák átmérője 50-100 nm közötti, és az ún. multivezikuláris testek exocitózisával jutnak az intercelluláris térbe spontán illetve különböző stimulusok hatására is [23,24]. A mikrovezikulák ezzel szemben nagyobb méretűek, 100-1000 nm átmérővel rendelkeznek, és közvetlenül a sejtet határoló plazmamembránról fűződnek le különböző stimulusokra [25]. Az exoszómákra és mikrovezikulákra egyaránt jellemző, hogy rengeteg membrán asszociált proteint – köztük nagyon sok membrán receptort –, viszont nagyon kevés sejtmagi eredetű fehérjét tartalmaznak. Mind a két EV populációra jellemző, hogy a nem kódoló RNS molekulákon kívül nagyon sok miRNS-t és mRNS-t szállítanak, amit a sejtek át is írnak, miután felvették. A miRNS-ek poszttranszkripció szabályozásért is felelősek és epigenetikus változásokban is szerepük van. Az exoszómáknak ezen kívül az MHCII-peptid komplexek szállításában és az antigén prezentációban is szerepük van, valamint számos nem klasszikus módon (leaderless, nincs N-terminális szignálszekvencia) szekretálódó fehérje szekréciójáért is felelősek [26,27].

Saját kutatásaim során is tapasztaltam, hogy sajnos gyakori és nagy problémát jelent a gyakorlatban, hogy az MSC-k plaszticitása rövid időn belül radikálisan csökken, mígnem bekövetkezik a szenescencia állapota. Az *in vitro* kísérletes munkákkal kapcsolatban viszont általános érvényű elvárás, hogy amennyire lehetséges, alacsony passzázs-számú MSC-k kerüljenek felhasználásra. A hosszadalmas, sztenderdizálást-optimalizációt igénylő kísérletek esetében – mint amilyen az MSC-eredetű extracelluláris vezikulákkal végzett kutatómunka is

– óriási haszna lehet egy immortalizált mezenchimális őssejt-vonalnak, feltéve persze, hogy ezek a sejtek rendelkeznek a primer sejtek azon tulajdonságaival, amelyek a kísérletes munka szempontjából relevánsak. A kapott eredmények validálása a primer kultúrákon persze elkerülhetetlen lenne, de mindenképpen megkönnyítené a munkát, és az értékes primer kultúrák további felhasználása sem kerülne veszélybe. A replikatív szeneszcencia jelenségén kívül további problémát okoz a primer kultúrák nagyfokú heterogenitása is. Az MSC-k felhasználásával végzett *in vitro* munkák reprodukálhatósága nagymértékben megkérdőjelezhető, mivel a kísérletek során általában különböző donorokból származó, és nagyon eltérő élettartamú primer sejteket használnak. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy például az egészséges donorokból izolált csontvelő-eredetű MSC tenyészetek feltűnő heterogenitást mutatnak a növekedés, valamint a differenciálódási képesség tekintetében is, és ez a heterogenitás semmilyen módon nem hozható összefüggésbe a donorok életkorával vagy nemével [28]. A heterogenitás problémája szintén kiküszöbölhető lenne primer MSC kultúrákból létrehozott immortális MSC vonalak létrehozásával.

## **Célkitűzések**

1. Elsődleges célunk a T limfociták és zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek közötti transzportfolyamatok vizsgálata volt, melynek során a membrán összetevők és a citoplazma transzportját egyaránt nyomon követtük. Ebben a folyamatban külön megvizsgáltuk az egyes extracelluláris vezikula populációk – mikrovezikulák és exoszómák – szerepét, és összehasonlítottuk a ko-kultúrákban lezajló folyamatokkal. A sejtmembrán jelölését PKH67 fluoreszcens festék segítségével végeztük, a citoplazma átadását pedig calcein-esszé segítségével követtük nyomon.
2. A humán T limfociták mellett C57Bl6 törzsből származó egér timociták, humán Jurkat limfóma sejtek, valamint zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek között is megvizsgáltuk a membrán és citoplazma komponensek átadásának hatékonyságát, és az emberi MSC-k mellett egerből származó, szintén zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteket is felhasználtunk. Az allogén kísérleti modellek mellett tehát xenogén modellek tesztelését és célul tűztük ki.
3. A citoplazmatikus komponensek átadásának pontos folyamatát tisztázandó megvizsgáltuk külön a mikrovezikulák, valamint a közvetlen sejt-sejt kapcsolatok jelentőségét is. A

fluoreszcens calcein átadását a T limfociták és humán MSC-k között a ko-kultúrák konfokális mikroszkópos vizsgálatával próbáltuk kideríteni, ahol a membrán jelölést DiI, a citoplazma jelölését pedig calcein-esszé segítségével végeztük.

4. A mezenchimális őssejtek T limfocitákra gyakorolt immunszuppresszív aktivitásának vizsgálatára a T-sejtek receptor-specifikus, vagy mitogénnel történő aktiválását követően került sor. A T-sejt proliferáció gátlásán kívül – melynek vizsgálatához két különböző esszé is alkalmaztunk (resazurin és CFSE sejtproliferációs esszé) – a citotoxikus és helper T-sejtek interferon-gamma termelésének gátlását is tanulmányoztuk. A kísérletek során külön megvizsgáltuk a humán Zs-MSK-eredetű mikrovezikulák és exoszómák dóziszfüggő hatását, az extracelluláris vezikuláktól mentesített MSC-kondicionált médium (MSC-KM) hatását hígítási sort is alkalmazva, valamint a közvetlen ko-kultúrák esetében fellépő T-sejt proliferáció és IFN- $\gamma$  termelés gátlását. Ezeknél a kísérleteknél allogén kísérleti modellt alkalmaztunk, a ko-kultúrákban különböző sejtarányokat is teszteltünk. A sejtosztódás gátlásának vizsgálatát Jurkat sejtek esetében is elvégeztük, külön megvizsgálva az MSC-eredetű MV-k, EXO-k, MSC-KM hatását, valamint a humán MSC-k közvetlen jelenlétéből adódó gátló hatást ko-kultúra modellekben.
5. Munkánk során emberi donorból származó, zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek immortalizálását is célul tűztük ki, melynek megvalósításához lentivirális génbeviteli eljárást alkalmaztunk. A különböző immortális sejtvonalak létrehozását más-más gének illetve génkombinációk bevitelével valósítottuk meg: hTERT, Bmi-1, hTERT+Bmi-1, hTERT+SV40T. Célunk a továbbiakban annak vizsgálata volt, hogy ezek a sejtvonalak továbbra is megfelelnek-e a mezenchimális őssejtekkel szemben támasztott kritériumrendszernek, hosszan tartó tenyésztés során is megtartják-e multipotens állapotukat, vagyis differenciációs képességüket, valamint megőrzik-e genomi stabilitásukat.

## **Módszerek**

- A mikrovezikula és exoszóma preparátumokat a sejtkultúra felülúszókból a differenciál centrifugálás és gravitációs szűrés kombinációjával állítottuk elő.

- Az extracelluláris vezikulák méreteloszlását és koncentrációját dinamikus fényszórás mérések (Dynamic light scattering analysis, DLS), valamint az ún „*resistive pulse sensing*” jelenségen alapuló Izon qNano készülék segítségével határoztuk meg.
- Az extracelluláris vezikulák morfológia vizsgálatát transmissziós elektronmikroszkópia segítségével végeztük.
- A sejtek és extracelluláris vezikulák felszíni antigén-mintázatát – antitest-jelölést követően – áramlási citometriás vizsgálatok segítségével állapítottuk meg.
- A membrán vezikulák és citoplazmatikus eredetű anyagok átadásának vizsgálatához PKH67 fluoreszcens membrán jelölő festéket, szintén fluoreszcens DiI membránfestéket, valamint calcein-esszét használtunk. Az átadás hatékonyságát áramlási citométeres mérések segítségével állapítottuk meg, de ezen kívül konfokális lézer scanning mikroszkópia segítségével is megvizsgáltuk a ko-kultúrában lezajló folyamatokat.
- A mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű extracelluláris vezikulák és az MSC-kondicionált médium immunszuppresszív hatásának vizsgálatához resazurin sejtproliferációs-esszét, karboxifluoreszcein szukcinimidil észter sejtproliferációs-esszét (CFSE), valamint intracelluláris interferon-gamma (IFN-  $\gamma$ ) immunesszét használtunk.
- Az aktivált T limfocita eredetű extracelluláris vezikulák mezenchimális őssejtekre gyakorolt hatását prosztaglandin E<sub>2</sub> immunesszé segítségével bizonyítottuk.
- Az immortalizált mezenchimális őssejt-vonalak létrehozásához lentivirális génbeviteli eljárást alkalmaztunk.
- A provírus kópiaszámának meghatározásához, valamint a génexpressziós vizsgálatokhoz kvantitatív valós idejű PCR (RT-qPCR) reakciókat végeztünk.
- A különböző immortalizáló gének hatékony kifejeződését telomeráz enzimaktivitás méréssel (TRAPeze XL Telomerase Detection Kit), valamint a keletkezett géntermékek immuncitokémiai festésével is bizonyítottuk.

- A proliferációs -és sejtöregedés vizsgálatokhoz resazurin sejtproliferációs-esszét, valamint szenescencia-asszociált  $\beta$ -galaktozidáz festést használtunk.
- A primer őssejtek, valamint a sikeresen immortalizált őssejt-vonalak esetében is elvégeztük a differenciációs képesség vizsgálatát a következő módszerek segítségével:
  - *Immuncitokémiai vizsgálatok*
  - *ALP aktivitás kimutatása kromogén szubsztrát hozzáadásával*
  - *Extracelluláris kalcium kimutatása Alizarin vörös festéssel*
  - *Intracelluláris lipidcseppek kimutatása Oil Red O festéssel*
- A feltételezett transzformáció bizonyítására kariotípus meghatározást, valamint *in vivo* tumorképző képesség vizsgálatot végeztünk NOD/SCID gamma egerekben. Az ehhez kapcsolódó sejtciklus vizsgálatokat propidium-jodidos jelölést követően áramlási citométer segítségével végeztük.

## Eredmények

1. Sem az egér timociták, sem a humán T-sejtek vagy Jurkat limfóma sejtek nem képesek számottevő, Zs-MSK eredetű MV vagy EXO felvételére függetlenül attól, hogy allogén vagy xenogén kísérleti modellt alkalmaztunk. A ko-kultúra modellek esetében ugyanezt tapasztaltuk, ahol számottevő membránkomponens átadást nem tudtunk kimutatni.
2. Ezzel a megfigyeléssel összhangban azt találtuk, hogy az aktivált T-sejtek osztódását és IFN- $\gamma$  termelését az MSC-eredetű MV-k és EXO-k sem képesek gátolni még óriási feleslegben sem a sejtek számához viszonyítva.
3. Zs-MSK-k nagy mennyiségű membrán komponenset vettek fel, függetlenül attól, hogy ezek az összetevők melyik donor sejttől származtak. A ko-kultúra modellek eredményeit sikeresen reprodukáltuk megfelelő mennyiségű MV vagy EXO partikulum hozzáadásával, így sikerült bizonyítanunk, hogy a membrán komponensek átadásáért az extracelluláris vezikulák felelősek.
4. A funkcionális vizsgálatainkból az is kiderült, hogy az MSC-k aktivált T limfocita-eredetű EV-k hatására igen erőteljes PGE<sub>2</sub> termelést mutatnak, amely dóziszfüggő módon

megy végbe mind az MV, mind az EXO kezelés hatására. Ilyen módon sikerült bizonyítanunk, hogy a T limfociták az extracelluláris vezikulákon keresztül közvetlen módon képesek befolyásolni az MSC-k immunszuppresszív aktivitását.

5. Munkánk során megállapítottuk, hogy sem az egér timociták, sem a Jurkat limfóma sejtek nem képesek a MSC-eredetű citoplazmatikus calcein felvételére, viszont az MSC-k és T-sejtek között egy nagyon intenzív, kétirányú citoplazmatikus transzportfolyamat zajlik. A sejtplazma eredetű fluoreszcens calcein átadásához mindenképpen szoros sejt-sejt kapcsolatok szükségesek, és ebben a folyamatban az EV-k szerepe nem bizonyítható. Vizsgálataink során egy eddig még ismeretlen kölcsönhatás meghatározó szerepét sikerült bizonyítanunk, ahol a citoplazma intenzív átadása a két sejtípus között membrán nanocsöveken keresztül valósul meg.
6. Az aktivált T-sejt osztódásának és IFN- $\gamma$  termelésének gátlása szignifikánsan nagyobb volt a közvetlen sejt-sejt kapcsolatoknak köszönhetően, mint szolubilis faktorok és citokinek alkalmazása esetén, vagyis az MSC-KM használatánál. A membrán nanocsövek által biztosított, MSC-k és T-sejtek között zajló intenzív citoplazmatikus transzportfolyamat tehát a T-sejtek funkciójára bizonyítottan hatással van, és valószínűleg az őssejtek fenotípusára is befolyással bír.
7. Az MSC-k immortalizációját célzó kísérleteknél önmagában a Bmi-1 gén bevitelével sikerült jelentősen meghosszabítanunk a populáció élettartamát, ám 60. populációkettőződésnél (PD) a teljes populáció szenescenciát mutatott. A hTERT gén bevitele önmagában egy idő után transzformációt okozott bizonyos sejtekben, amelyek később jelentős szelektációs előnyre tettek szert (PD83 után).
8. A hTERT és Bmi-1 gének együttes bevitelével sikerült olyan stabil immortális Zs-MSK sejtvonalat létrehozni, amelynek alapvető tulajdonságai – többek között differenciációs potenciálja – a primer sejtekhez viszonyítva semmit sem változtak, és esetükben transzformációra utaló jelet sem találtunk.



## Következtetések

Annak ellenére, hogy számos erőfeszítés irányul a mezenchimális őssejtek immunszuppresszív aktivitásáért felelős mechanizmusok pontos tisztázására, amelyek a T limfociták funkcionális gátlásáért felelősek [29,30], a kontaktus-függő, valamint membránközvetített jelátviteli folyamatok még nem teljesen tisztázottak. A legfrissebb eredmények egybehangzóan azt mutatják, hogy az immunválasz szabályozásában aktívan részt vevő, különféle bioaktív molekulák szállításában membránnal határolt partikulumok is részt vesznek. Számos ilyen bioaktív molekuláról bebizonyosodott már, hogy szállításuk extracelluláris vezikulák közvetítésével zajlik [31-33].

A saját kutatási eredményeink azt mutatják, hogy sem az egér timociták – melyeket nagyrészt éretlen T sejtek alkotnak – sem a humán perifériás T limfociták nem képesek számottevő, zsírszövet-eredetű MSC-EV felvételére függetlenül attól, hogy allogén vagy xenogén kísérleti modellt alkalmaztunk. Ugyanez vonatkozik a T-sejt eredetű limfoblasztoid Jurkat sejtvonalra is. Ezzel a megfigyeléssel összhangban azt tapasztaltuk, hogy egyik EV populációnak sem volt funkcionális hatása a T limfocitákra nézve, az aktivált T-sejtek osztódását és IFN- $\gamma$  termelését az MSC-eredetű mikrovezikula és exoszómák nem voltak képesek gátolni. Érdekes módon a fordított kísérleti felállás esetében azt tapasztaltuk, hogy a Zs-MSK-k nagy mennyiségű membrán komponenset vettek fel, függetlenül attól, hogy ezek a membrán összetevők melyik donor sejttypustól származtak. A funkcionális vizsgálatainkból az is kiderült, hogy ha a mezenchimális őssejteket kezeljük aktivált T limfocita-eredetű extracelluláris vezikulákkal, az MSC-k válaszul egy igen erőteljes PGE<sub>2</sub> termelést mutatnak, amely dóziszfüggő módon megy végbe mind az MV, mind az EXO kezelés hatására.

A citoplazmatikus összetevők átadásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy sem az egér timociták, sem a Jurkat limfóma sejtek nem képesek a MSC-eredetű citoplazmatikus calcein felvételére, viszont az MSC – T-sejt ko-kultúra modelleknél megfigyeltük, hogy a két sejttypus között egy nagyon intenzív citoplazmatikus transzportfolyamat zajlik. Ebben az esetben viszont jelentős különbségeket tapasztaltunk az allogén és xenogén modellek között, amely azt sejteti, hogy a T limfociták részéről egy aktiv, membránösszetevőket érintő felismerési folyamat lehet meghatározó ebben a sejtes kölcsönhatásban. A citoplazmatikus calcein átadásához mindenképpen szoros sejt-sejt kapcsolatok szükségesek, és ebben a folyamatban az extracelluláris vezikulák szerepe nem bizonyítható. Hogy tisztázzuk, milyen mechanizmus felelős az intenzív és kölcsönös citoplazmatikus calcein transzportért az MSC-k és T-sejtek között, megvizsgáltuk a ko-kultúrákat konfokális mikroszkóp segítségével is.

Rengeteg, T limfocitáktól származó membrán nanocső volt megfigyelhető a ko-kultúrákban, amelyek direkt összeköttetést biztosítottak a szöveti őssejtekkel. Az MSC – Jurkat ko-kultúrák vizsgálata során a két sejttípus között ilyen direkt összeköttetést nem sikerült kimutatnunk, bár a Jurkat sejtek egymással sok esetben kapcsolódtak membrán nanocsövek segítségével.

Eredményeink alapján kijelenthetjük, hogy egy nagyon aktív kommunikáció zajlik a két sejtféleség között, melynek meghatározó résztvevői a T-sejt eredetű extracelluláris vezikulák, valamint a szintén T-sejt eredetű membrán nanotubulusok. A T-sejtektől származó mikrovezikulák és exoszómák felvétele, valamint a nanocsöveken keresztül történő citoplazmatikus komponensek átadása egyértelműen megváltoztatja a Zs-MSK-k immunmoduláló aktivitását, egy méginkább szuppresszív fenotípust eredményezve, és egyben indukálva olyan gyulladásgátló szolubilis faktorok termelését is, mint például a PGE<sub>2</sub>. Kísérleteinkből az is kiderült, hogy citoplazmatikus összetevők átadása kétirányú az MSC-k és T-sejtek között, amiből az következik, hogy MSC-eredetű citoplazma összetevők is közvetlenül hatással lehetnek a T limfociták funkciójára.

Munkánk második nagy fejezetében emberből származó primer, zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejteket immortalizáltunk lentivirális génbeviteli rendszer segítségével. A primer mezenchimális őssejtek felhasználásával végzett kutatómunka során fellépő két sarkalatos probléma, a minták nagyfokú heterogenitása, valamint a replikatív szenescencia problémája is kiküszöbölhető primer MSC kultúrákból létrehozott immortalis sejtvonalak létrehozásával és alkalmazásával. A mezenchimális őssejtek transzdukciója során a hTERT gén bevitelét kombináltuk a Bmi-1 és SV40T gének bevitelével. Munkánk során teszteltük azt is, hogy a hTERT vagy Bmi-1 gének bevitele önmagában képes-e a Zs-MSK-k immortalizálására, vagy csak együttes kifejeztetésük képes ezt sikeresen megvalósítani.

A Bmi-1 gén bevitelét követően azt tapasztaltuk, hogy az átlagos provírus kópiaszám az idő előrehaladtával növekedett. Eszerint bizonyos Zs-MSK<sup>Bmi-1</sup> klónok, melyek magasabb szinten expresszálták a Bmi-1 gént, szelekciós előnyre tettek szert a populáció egyéb sejteivel szemben, viszont a populáció végül nem volt képes elkerülni a szenescencia állapotát és végül osztódásuk leállt (60. populációkettőződés).

A hTERT gén bevitelét követően szembesülnünk kellett azzal, hogy önmagában a hTERT által biztosított korlátlan replikációs képesség bizony meglehetősen termékeny talajt biztosít a potenciálisan transzformáló mutációk megszerzéséhez. A 83. populációkettőzést követően a populációban szelekciós előnyre tett szert egy olyan klón, amely transzformálódott. Ez a klonális eredetű sejtvonal jóval intenzívebb sejtosztódást mutatott az eredeti populációhoz

képest, szenescencia-asszociált  $\beta$ -Galaktozidáz festődést nem mutatott, és a kontaktgátlás teljes hiányát mutatta.

A hTERT és Bmi-1 gének együttes bevitelével viszont sikerült olyan immortális Zs-MSC sejtvonalat létrehozunk, amelynek differenciációs potenciálja a primer sejtekhez viszonyítva semmit sem változott, és esetükben transzformációra utaló jelet sem tapasztaltunk.

## Irodalomjegyzék

1. Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
2. Caplan AI and SP Bruder. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* 7:259-264.
3. Abu Kasim NH, V Govindasamy, N Gnanasegaran, S Musa, PJ Pradeep, TC Srijaya and ZACA Aziz. (2012). Unique molecular signatures influencing the biological function and fate of post-natal stem cells isolated from different sources. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9:E252–E266.
4. Meirelles LDS, PC Chagastelles and NB Nardi. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 119:2204-2213.
5. Hass R, C Kasper, S Bohm and R Jacobs. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling* 9:12.
6. Wang Y, X Chen, W Cao and Y Shi. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology* 15:1009-1016.
7. Sun LY, DD Wang, J Liang, HY Zhang, XB Feng, H Wang, BZ Hua, BJ Liu, SQ Ye, XA Hu, WR Xu, XF Zeng, YY Hou, GS Gilkeson, RM Silver, LW Lu and ST Shi. (2010). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Severe and Refractory Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 62:2467-2475.
8. Gao F, SM Chiu, DA Motan, Z Zhang, L Chen, HL Ji, HF Tse, QL Fu and Q Lian. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 7:e2062.

9. Bai L, DP Lennon, AI Caplan, A DeChant, J Hecker, J Kranso, A Zaremba and RH Miller. (2012). Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nature Neuroscience* 15:862-U86.
10. Gordon D, G Pavlovska, JB Uney, DC Wraith and NJ Scolding. (2010). Human Mesenchymal Stem Cells Infiltrate the Spinal Cord, Reduce Demyelination, and Localize to White Matter Lesions in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69:1087-1095.
11. Gebler A, O Zabel and B Seliger. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine* 18:128-134.
12. Najar M, G Raicevic, H Fayyad-Kazan, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2016). Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 18:160-171.
13. Tyndall A. (2014). Mesenchymal stem cell treatments in rheumatology-a glass half full? *Nature Reviews Rheumatology* 10:117-124.
14. Castro-Manrreza ME and JJ Montesinos. (2015). Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of Immunology Research* 2015:394917.
15. Aggarwal S and MF Pittenger. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822.
16. Blazquez R, FM Sanchez-Margallo, O de la Rose, W Dalemans, V Alvarez, R Tarazone and JG Casadol. (2014). Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Frontiers in Immunology* 5:556.
17. Conforti A, M Scarsella, N Starc, E Giorda, S Biagini, A Proia, R Carsetti, F Locatelli and ME Bernardo. (2014). Microvesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells Are Not as Effective as Their Cellular Counterpart in the Ability to Modulate Immune Responses In Vitro. *Stem Cells and Development* 23:2591-2599.
18. Zhang B, Y Yin, RC Lai, SS Tan, ABH Choo and SK Lim. (2014). Mesenchymal Stem Cells Secrete Immunologically Active Exosomes. *Stem Cells and Development* 23:1233-1244.
19. Di Trapani M, G Bassi, M Midolo, A Gatti, PT Kanga, A Cassaro, R Carusone, A Adamo and M Krampera. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Scientific Reports* 6.

20. Simons M and G Raposo. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21:575-81.
21. Greening DW, SK Gopal, R Xu, RJ Simpson and W Chen. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 40:72-81.
22. Raposo G and W Stoorvogel. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* 200:373-383.
23. Blanchard N, D Lankar, F Faure, A Regnault, C Dumont, G Raposo and C Hivroz. (2002). TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *Journal of Immunology* 168:3235-3241.
24. Wahlgren J, TDL Karlson, P Glader, E Telemo and H Valadi. (2012). Activated Human T Cells Secrete Exosomes That Participate in IL-2 Mediated Immune Response Signaling. *Plos One* 7:e49723.
25. Osteikoetxea X, A Balogh, K Szabo-Taylor, A Nemeth, TG Szabo, K Paloczi, B Sodar, A Kittel, B Gyoergy, E Pallinger, J Matko and EI Buzas. (2015). Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties. *Plos One* 10: UNSP e0121184
26. Yanez-Mo M, PRM Siljander, Z Andreu, AB Zavec, FE Borrás, EI Buzas, K Buzas, E Casal, F Cappello, J Carvalho, E Colas, A Cordeiro-da Silva, S Fais, JM Falcon-Perez, IM Ghobrial, B Giebel, M Gimona, M Graner, I Gursel, M Gursel, NHH Heegaard, A Hendrix, P Kierulf, K Kokubun, M Kosanovic, V Kralj-Iglic, EM Kramer-Albers, S Laitinen, C Lasser, T Lener, E Ligeti, A Line, G Lipps, A Llorente, J Lotvall, M Mancek-Keber, A Marcilla, M Mittelbrunn, I Nazarenko, ENM Nolte-t' Hoen, TA Nyman, L O'Driscoll, M Olivan, C Oliveira, E Pallinger, HA del Portillo, J Reventos, M Rigau, E Rohde, M Sammar, F Sanchez-Madrid, N Santarem, K Schallmoser, MS Ostendorf, W Stoorvogel, R Stukelj, SG Van der Grein, MH Vasconcelos, MHM Wauben and O De Wever. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4: 27066
27. El Andaloussi S, I Maeger, XO Breakefield and MJA Wood. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12:348-358.
28. Phinney DG, G Kopen, W Righter, S Webster, N Tremain and DJ Prockop. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 75:424-436.

29. Ma S, N Xie, W Li, B Yuan, Y Shi and Y Wang. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation* 21:216-225.
30. Bernardo ME and WE Fibbe. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* 13:392-402.
31. de Candia P, V De Rosa, M Casiraghi and G Matarese. (2016). Extracellular RNAs: a secret arm of immune system regulation. *J Biol Chem* 291:7221-7228.
32. Gyorgy B, TG Szabo, M Pasztoi, Z Pal, P Misjak, B Aradi, V Laszlo, E Pallinger, E Pap, A Kittel, G Nagy, A Falus and EI Buzas. (2011). Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:2667-2688.
33. Katsuda T, N Kosaka, F Takeshita and T Ochiya. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics* 13:1637-1653.

#### **A tézisek alapjául szolgáló publikációk**

**Zsolt Matula**, Andrea Németh, Péter Lőrincz, Áron Szepesi, Anna Brózik, Edit Irén Buzás, Péter Lőw, Katalin Német, Ferenc Uher, Veronika S. Urbán: *The Role of Extracellular Vesicle and Tunneling Nanotube-Mediated Intercellular Cross-Talk Between Mesenchymal Stem Cells and Human Peripheral T Cells*. *Stem Cells and Development*; 25:1818-1832 (2016) **(IF: 3,562)**

Péter Tátrai, Áron Szepesi, **Zsolt Matula**, Anna Szigeti, Gyöngyi Buchan, András Mádi, Ferenc Uher, Katalin Német: *Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*; 422:28-35 (2012) **(IF: 2,406)**

Áron Szepesi, **Zsolt Matula**, Anna Szigeti, György Várady, József Szalma, Gyula Szabó, Ferenc Uher, Balázs Sarkadi, Katalin Német: *In Vitro Characterization of Human Mesenchymal Stem Cells Isolated from Different Tissues with a Potential to Promote Complex Bone Regeneration*. *Stem Cells International*; 2016:3595941 (2016) **(IF: 3,54)**

#### **A tézisek témájához szorosan nem kapcsolódó közlemények**

Dóra Mihály, **Zsolt Matula**, Yi-Che Changchien, Gergő Papp, Péter Tátrai, Zoltán Sági

First cloned human immortalized adipose derived mesenchymal stem-cell line with chimeric SS18-SSX1 gene (SS-iASC). *Cancer Genetics*; 216-217: pp. 52-60. (2017) **(IF: 1,93)**

Zsuzsanna Nerada, Zoltán Hegyi, Áron Szepesi, Szilárd Tóth, Csilla Hegedüs, György Várady, **Zsolt Matula**, László Homolya, Balázs Sarkadi, Ágnes Telbisz: *Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level*. *Cytometry Part A*; 89:826-34 (2016) **(IF: 3.222)**

**Zsolt Matula**, Gyöngyi Kudlik, Veronika S. Urbán, Ferenc Uher: Quo vadis hematology? *Orvosi Hetilap*; 157:1819-1829 (2016) **(IF:0,349)**

Gyöngyi Kudlik, **Zsolt Matula**, Tamás Kovács, Veronika S. Urbán, Ferenc Uher: *At the border of pluri- and multipotency: the neural crest stem cells*. *Orvosi Hetilap*; 156:1683-94 (2015) **(IF:0,291)**

Áron Szepesi, **Zsolt Matula**, Anna Szigeti, György Várady, Gyula Szabó, Ferenc Uher, Balázs Sarkadi, Katalin Német: *ABCG2 is a selectable marker for enhanced multilineage differentiation potential in periodontal ligament stem cells*. *Stem Cells and Development*; 24:244-52 (2014) **(IF: 3,777)**

Veronika Kovács- Haász, Bettina Dulka, Zita Pöstényi, András Polyák, **Zsolt Matula**, Anna Szigeti, Ana Ivanovska, Julianna Thuróczy, Ferenc Uher, Katalin Német, Lajos Balogh: *A mesenchymalis őssejtek felhasználásának lehetőségei az állatorvosi kutatásokban és gyógyításban 1. rész: Irodalmi áttekintés*. *Magyar Állatorvosok Lapja*; 138:(6) pp. 349-360. (2016) **(IF: 1,89)**

Veronika Kovács- Haász, Bettina Dulka, Zita Pöstényi, András Polyák, **Zsolt Matula**, Anna Szigeti, Ana Ivanovska, Julianna Thuróczy, Ferenc Uher, Katalin Német, Lajos Balogh: *A mesenchymalis őssejtek felhasználásának lehetőségei az állatorvosi kutatásokban és gyógyításban 2. rész: Saját vizsgálatok*. *Magyar Állatorvosok Lapja*; 138:(7) pp. 401-412. (2016) **(IF: 1,89)**

Gyöngyi Kudlik, Zsolt Matula, Veronika S Urbán, Ferenc Uher: A makrofágpolarizáció szerepe a sebgyógyulásban és a szövetregenerációban. Immunológiai szemle; 7:(1) pp. 27-37. (2015) **(IF: 0)**



