

A mesenchymalis őssejtek szerepe az immunválasz szabályozásában

Doktori értekezés

Hegyi Beáta

Semmelweis Egyetem
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Prof. Habil. Uher Ferenc tudományos főmunkatárs, Ph.D.

Hivatalos bírálók: Dr. Nagy György egyetemi adjunktus, Ph.D.
Dr. Lőw Péter egyetemi docens, Ph.D.

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Budás Edit intézetvezető egyetemi
professzor

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára egyetemi docens, Ph.D.
Dr. László Lajos egyetemi docens,
a biol. tud. kandidátusa

Budapest
2013

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
Bevezetés és irodalmi áttekintés	8
1. A mesenchymalis őssejt jellemzése	8
2. Immunszuppresszió <i>in vitro</i> kísérleti rendszerekben	11
3. Az MSC-k immunszuppressziójának <i>in vivo</i> bizonyítékai	13
4. A gátlás mechanizmusa	14
5. A kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE)	17
6. A mikroglia sejtek	19
Célkitűzések	24
Módszerek	25
1. Kísérleti állatok	25
2. Mesenchymalis ős-/stroma sejtek izolálása és tenyésztése	25
3. A mesenchymalis stroma sejtek differenciáltatása	26
4. Áramlási citometria	26
5. T-sejtek tisztítása	27
6. T-sejt proliferáció gátlása	27
7. Szekretált fehérjék kimutatása sejt kultúra felülúszókból	28
8. A mesenchymalis őssejtek <i>in vitro</i> stimulációja	28
9. A kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) betegségmodell indukciója és követése	28
10. Kevert glia kultúrák készítése és a mikroglia sejtek izolálása	29
11. Mikroglia sejtek morfológiai analízise (immuncitokémia)	30
12. Mikroglia sejtek élesztő és apoptotizáló thymocytá fagocitózisának vizsgálata ..	31
13. Mikroglia sejtek antigén prezentáló képességének mérése	32

14. A regulátor T-sejtek arányában bekövetkező változások vizsgálata	32
15. Géntermékek kimutatása mRNS szinten, kvantitatív real-time PCR-rel.....	32
16. Statisztika.....	34
Eredmények.....	35
1.A mesenchymalis őssejt populációk jellemzése: felszíni markerek és differenciálódási képesség	35
2. Az MSC-k immunszuppresszív és gyulladásgátló képességének vizsgálta	38
2.1. A mitogén és alloantigén-indukált T-sejt proliferáció gátlása <i>in vitro</i> kultúrában	38
2.2. Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása különböző enzim gátlók jelenlétében	40
2.3. Az MSC-k prosztaglandin E2 (PGE2) termelése aktivált T sejtek jelenlétében	41
2.4. A gyulladós környezet hatása a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2 termelésének szabályozására	43
2.5 Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása <i>in vivo</i> betegség modellben – a kísérletes autoimmun encephalomyelitis őssejtterápiája.....	47
3. Az MSC-k mikroglia sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata	49
3.1 A mikroglia sejtek karakterizálása és morfológiájuk változása MSC-k jelenlétében.....	49
3.2 A mikroglia sejtek élesztő és apoptotizáló thymocytá fagocitózisának vizsgálata	51
3.3 A mikroglia sejtek citokin termelése MSC-k jelenlétében.....	54
3.4 Az MSC-k hatása a mikroglia sejtek antigén bemutató képességére	58
3.5 Az inflammaszómák szerepe a mikroglia-MSK kölcsönhatásban	61
Megbeszélés.....	63
Következtetések.....	72
Összefoglalás	73

Abstract.....	74
Irodalomjegyzék	75
Saját publikációk jegyzéke	86
Köszönetnyilvánítás	88

Rövidítések jegyzéke

APC: (antigen presenting cell) antigén-bemutató sejt

Arg-1: (arginase-1) argináz-1

BMT: (bone marrow transplantation) csontvelő transzplantáció

Csv-MSc: csontvelői mesenchymalis őssejt

CFU-F: (colony forming unit-fibroblast) fibroblast kolóniát képző sejt

CFA: (complete Freund adjuvant) komplett Freund adjuváns

CLP: (cecal ligation and puncture) caecum elkötését követő bélroncsolás

ConA: concanavalin A

COX: ciklooxigenáz enzim

CpG: citozin és guanin nukleotid foszfodiészter kötéssel összekapcsolva

CX3CR1: (chemokine (C-X3-C motif) receptor 1) CX3C receptor 1, fraktalkin receptor

DC: (dendritic cell) dendritikus sejt

DMEM: Dulbecco-által módosított Eagle-féle médium

dsRNS: duplaszálú RNS

EAE: (experimental autoimmune encephalomyelitis) kísérletes autoimmun encephalomyelitis

ECM: extracelluláris mátrix

EGF: (epidermal growth factor), epidermalis növekedési faktor

ELISA: (enzyme-linked immunosorbent assay) enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálat

ESC: (embryonic stem cell) embrionális őssejt

FACS: (fluorescent-activated cell sorting/flow cytometry) áramlási citometria

FCS: (foetal calf serum) főtális borjú savó

FITC: fluorescein izotiocianát

GFP: (green fluorescent proteine) zöld fluoreszkáló fehérje

GVHD: (graft-versus-host disease) graft-versus-host betegség

HE: Hematoxylin–eosin

HGF: (hepatocyte growth factor) hepatocita növekedési faktor

HLA: (human leukocyte antigen) humán leukocita antigén

HS: (horse serum) lósavó

Hsp60, HSp70: (heat shock protein) hősokk fehérjék
IDO: indolamin-2,3-dioxigenáz enzim
IL-1 β , IL-6, IL-10: interleukin-1 β , -6, és -10
Indo: indometacin
INF- γ : gamma interferon
L-NMA: N-metil-L-arginin-acetát
LPS: lipopoliszacharid
LRR: (leucine-rich repeat): leucinban gazdag ismétlődő szekvencia
MBP: (myelin basic protein) mielin bázikus fehérje
M-CSF: (macrophage colony-stimulating factor) makrofág kolónia-stimuláló faktor
MCP1: (monocyte chemoattractant protein 1) monocyta kemoattraktáns fehérje 1
MHC-I vagy -II: (main histocompatibility complex) fő hisztokompatibilitási génkomplexek
MLR: (mixed lymphocytic reaction) kevert limfocita kultúra
MMLV: (Moloney murine leukemia virus) Moloney egér leukémia vírus
MOG: mielin oligodendrocita glikoprotein
MSC: (mesenchymal stem cell) mesenchymalis őssejt
1-MT: metil-triptofán
NF κ B: nukleáris faktor κ B
NK sejt: (natural killer cell) természetes ölősejt
NALP3: (NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3) NACHT, LRR és PYD domáineket tartalmazó fehérje 3
NLRP3: (NLR family, pyrin domain containing 3) NLR család, pirin domain tartalmú fehérje 3
NO: nitrogén-monoxid
NOD: (non obese diabetes mouse) elhízással nem járó diabeteses egértörzs
NOS: nitrogén-oxid-szintáz enzim
OVA: ovalbumin
Pam3Cys: N-palmitoil-S-[2,3-bis(palmitoiloxi)-(2RS)-propil]-[R]-cisztein
PBS: (phosphate buffered saline) foszfáttal-pufferelt sóoldat
PCR: (polymerase chain reaction) polimeráz láncreakció
PE: (phycoerythrin) fikoeritrin

PFA: paraformaldehid

PGE2: prosztaglandin E2

PLL: poly-L-lizin

PLP: proteolipid protein

poly-IC: poliinozin-policitidin

PSP: (polimicrobial septic peritonitis) polimikrobiális peritoneális szepszis

RS-MSC: (rapidly self-renewing mesenchymal stem cells) gyors önmegújításra képes mesenchymalis őssejtek

Sca-1: (stem cell antigen 1) őssejt-antigén-1

SDS: (sodium dodecyl sulfate) nátrium-dodecil-szulfát

SLE: (systemic lupus erythematosus) szisztémás lupus erythematosus

TGF β : (transforming growth factor β) transzformáló növekedési faktor β

Th1 és Th2: 1-es és 2-es típusú helper T-sejtek

TLR: Toll-like receptor

TNF- α : tumor-nekrózis faktor α

Treg: regulátor T-sejt

TSG6: (Tumor necrosis factor-inducible gene 6) TNF- α indukálta gén 6 által kódolt fehérje

VEGF: (vascular endothelial growth factor) vascularis endothelialis növekedési faktort

Zs-MSC: zsírszövet eredetű mesenchymalis őssejt

Bevezetés és irodalmi áttekintés

Őssejtnek nevezünk minden olyan klonogén sejtet, amely aszimmetrikus osztódások révén önfenntartásra és egy vagy több differenciálódott sejtípus vagy sejtfejlődési sor létrehozására képes. Közismert példája a pluripotens, embrionális őssejt populáció, amelyből a fejlődő embrió minden szerve és szövete kifejlődik (kivéve az extraembrionális burkokat). Azonban a felnőtt szervezetben is található őssejtek, amelyeket a „multipotens” és/vagy a „szöveti” jelzőkkel szokás illetni, hiszen differenciálódási képességük korlátozottabb (általában csak az azoknak otthont adó szerv jellegzetes sejtípusaivá tudnak érni). Feladatuk a sérült, öregedő vagy elpusztult testi sejtek pótlása révén a folyamatos megújulás és regeneráció biztosítása. [1, 2]

1. A mesenchymalis őssejt jellemzése

A mesenchymalis ős- vagy stroma sejtek (röviden MSC-k) olyan multipotens szöveti őssejtek, amelyek az egész szervezetben fellelhetőek és fontos szerepet játszanak több szerv/szövet önfenntartásában és regenerációjában, de hatással vannak a vérképzésre és az immunválasz folyamataira is [3]. Elsőként Friedenstein és mtsai [4] írtak le a csontvelőben olyan fibroblast-szerű morfológiát mutató, kolónia-képző sejteket, amelyeket CFU-F-nek (fibroblast-kolóniát képző sejtnek) neveztek el. Ezek a sejtek *in vitro* kultúrában a tenyésztőedények falához tapadva nőnek (adherensek), megfelelő induktorok jelenlétében képesek csont- és porcszövet irányba differenciálódni, és még bőr alá oltva is képesek vérképzést támogató stromát (azaz ektopikus csontot) kialakítani [5]. Ezt a sejtpopulációt napjainkban mesenchymalis őssejteknek, mesenchymalis stroma sejteknek vagy multipotens stroma sejteknek nevezzük.

Egyre több kísérleti eredmény támasztja alá, hogy az MSC-k nem csak a csontvelőben található meg, hiszen sikeresen izoláltak már azokhoz hasonló sejteket számtalan faj különféle szerveiből és szöveteiből is [6, 7]. Emberben például a csontvelőnél sokkal könnyebben elérhető forrásuk a zsírszövet [8], vagy a köldökzsínór Wharton kocsonya állománya [9].

Az izolált mesenchymalis sejt kultúrák azonban nem tekinthetők homogénnek, hiszen a tenyészetekben állandóan zajló spontán differenciáció miatt a multipotens őssejtek mellett mindig találunk bi- vagy unipotens, sőt akár terminálisan differenciálódott alakokat is [10]. Éppen ezért igen fontos lenne pontosan definiálni, hogy milyen sejteket nevezhetünk MSC-knek, és hogyan tudjuk egyértelműen azonosítani őket. Meghatározásukat és izolálásukat nehezíti azonban, hogy a felfedezésük óta eltelt több mint 40 évben sem sikerült egyetlen olyan sejt felszíni markert találni, amely csak és kizárólag ezeken a sejteken jelenik meg. Ennek hiányában az ISCT (International Society for Cellular Therapy) 2006-ban kiadott javaslatának megfelelően az alábbiak szerint történik az emberi MSC-k azonosítása:

1, standard tenyésztési körülmények között adherens, általában orsó alakú, elnyúlt, fibroblasta emlékeztető morfológiájú sejtek;

2, CD73, CD90 és CD105 sejt felszíni markerekre pozitívak, de nem expresszálnak vérsajtfejlődési sorokra jellemző markereket, úgymint CD45-öt, CD34-et, CD14-et, CD11b-t, CD79a-t és CD19-et;

3, megfelelő induktorok jelenlétében osteoblast, adipocita és chondrocyta irányba differenciálódnak *in vitro* [11].

Számos munkacsoport igyekezett megtalálni ennek a heterogén populációnak a legfejlődékesebb, „legősibb” sejtjeit. Colter és mtsai [12] például leírtak egy gyors önmegújításra képes szubpopulációt (RS-MS), amelynek sejtjei kisebb méretük és szélesebb körű differenciációs képességük miatt kitűntek a többi közül. Ez a sejt populáció tapasztalatuk szerint csak a korai átoltások során van jelen és a nagy sejtsűrűségben történő tenyésztés során fokozatosan eltűnik. Mivel ezeket a sejteket sem jellemzi egyedi sejt felszíni marker-kombináció és emiatt csak nehézkesen, erősen szubjektív alapon különíthetőek el a többi sejtől, ezért az RS-MS definíció nem is terjedt el a szakirodalomban. Így napjainkban is a laboratóriumok zömében a teljes, heterogén mesenchymalis sejttenyészetben zajlanak a vizsgálatok, ami sok esetben megnehezíti az eredmények reprodukálását és összehasonlítását.

Az elmúlt években az emberi MSC-k a klinikumban való lehetséges felhasználhatóságuk miatt nyertek különösen nagy figyelmet. A kutatások egy jelentős részében az MSC-k szövetregenerációt támogató képességét szeretnék terápiás célra hasznosítani. Állatkísérleti tapasztalatok szerint az *in vivo* kultúrában felszaporított és a

szervezetbe visszajuttatott MSC-k szétszóródnak a dús érhálózattal rendelkező szervekben (mint pl. a tüdő, a vese vagy a lép), de sérülés, vagy gyulladás esetén – kémiai ingerek hatására – egy részük mindenképpen az érintett területre vándorol, ahol kulcsszerepet játszik az adott szerv, illetve szövet regenerációjában [13]. A számtalan sikeres állatkísérlet után ma már folyik az „MSC-terápia” klinikai kipróbálása is: különböző munkacsoportok porc- és csontsérülések gyógyításával, szívinfarktuson átesett betegek és gerincsérültek kezelésével próbálkoznak (részletesebben lásd bevezetés 3. fejezete).

A terápiás hatás mechanizmusát azonban nem ismerjük. Annyi bizonyos, hogy az MSC-k sokszor nem épülnek be (vagy legfeljebb igen kis számban) a sérült szövetbe, azaz nem alakulnak át (nem transzdifferentiálódnak) tömegesen például szívizomrostokká vagy idegsejteké a szervezetben, sokkal inkább közvetett módon segítik a károsodott szövetek regenerációját. Olyan fehérjéket termelnek, amelyek gátolják a további sejtpusztulást, elősegítik új vérerek képződését – azaz javítják az érintett terület oxigén- és tápanyagellátását –, és fokozott működésre készítetik a sérült szövetben/szervben található, helyi őssejteket [14].

A szövetregeneráció támogatásán túl a mesenchymalis őssejtek talán legígéretesebb tulajdonságai hipoimmunogenitásuk, illetve kifejezett immunszuppresszív sajátosságuk. Számos tanulmány adott hírt arról, hogy ezek a sejtek kitüntetettek, mert képesek elkerülni az immunsejtek „figyelmét”, azaz nem váltanak ki immunválaszt még allogén környezetben sem [15, 16]. A hipoimmunogenitás mechanizmusa máig sem tisztázott pontosan, de valószínűleg szoros összefüggésben áll azzal, hogy a sejtek felszínén csak kevés MHC-I fejeződik ki, nem jelennek meg MHC-II antigének és a kostimulátor molekulák is hiányoznak róluk (pl. CD40, CD80, CD86) [16]. Ugyanakkor egyes vizsgálatokban az MSC-k mégis antigén prezentálóknak bizonyultak [17]. Chan és munkatársainak eredményei szerint interferon gamma (INF- γ) kezelést követően bizonyíthatóan megnő az MSC-k felszínén az MHC-II mennyisége, amely végső soron alkalmassá teszi ezeket a sejteket arra, hogy a T-sejt választ váltsanak ki [18]. Ez azonban nem zárja ki, hogy az MSC-eket hipoimmunogénnek tekinthessük, hiszen az imént említett stimuláló hatás csak egy szűk, alacsony IFN- γ koncentráció-tartományban érvényesül. A gyulladásos környezetben, lokálisan kialakuló, ennél jóval

magasabb IFN- γ dózis hatására azonban az MSC-k továbbra is hipoimmunogénnek bizonyultak.

Ráadásul, mint az utóbbi években kiderült, az MSC-k jelentős gyulladáscsökkentő és immunszuppresszív aktivitással is rendelkeznek. Nincs olyan, a természetes és/vagy az adaptív immunválaszban részt vevő sejt, aminek működését az MSC-k ne befolyásolnák [19-21]. Terápiás hatékonyságuk szempontjából ez meghatározó lehet, hiszen minden sejtpusztulással járó folyamat – legyen az mechanikai sérülés, fertőzés vagy éppen autoimmun folyamat következménye – védekező reakciót indít el a szervezetben.

2. Immunszuppresszió in vitro kísérleti rendszerekben

A mesenchymalis őssejtek széles-spektrumú immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek, hiszen mind a veleszületett, mind pedig az adaptív immunrendszer sejtjeinek érését, aktivációját, proliferációját és/vagy differenciációját képesek gátolni, ezzel pedig funkcionálisan válaszképtelen állapotba juttatják azokat [19, 22]. Az első, erre vonatkozó publikációkban emberi [23, 24] és egér [25] mesenchymalis őssejtekről is kimutatták, hogy képesek mérsékelni a T-sejtek aktivációját és azt követő proliferációjukat *in vitro*. Hasonló gátlás volt kimutatható autológ és allogén MSC-k esetében is [24], mind alloantigén, mind pedig mitogén indukált T-sejt proliferáció vizsgálatakor [23]. Az érintett T-sejtek általában nem pusztulnak el, csak „elakadnak” a sejtciklus korai, G0/G1 fázisában (anergiássá válnak). Citokin termelésük is megváltozik, az IFN- γ , tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), IL-6 és IL-17 mennyisége jelenősen csökken a sejtek felülúszójában, míg az IL-4 és IL-10 koncentrációja nő. Az MSC-k tehát a sejtosztódás gátlása mellett valószínűleg megváltoztatják az egyes és kettes helper T sejtek (Th1/Th2 sejtek) arányát is [26]. Az is nyilvánvalóvá vált, hogy a mesenchymalis őssejtek és a T-sejtek közötti kapcsolat nem egyirányú, hiszen a proliferáció gátlását okozó faktorok immunsejtek jelenléte nélkül nem, vagy csak igen kis mennyiségben ürülnek az MSC-kból. Azonban a limfociták (és az *in vitro* kísérleti rendszerben – legalábbis kis mennyiségben - óhatatlanul jelen lévő monociták, makrofágok vagy NK sejtek) által termelt gyulladáscsökkentő citokinek (pl. az IFN- γ , TNF- α vagy IL-1 β) jelenléte képes fokozni az MSC-k immunszuppresszív mediátor

termelését [27, 28]. Tehát a mesenchymalis őssejtek vélhetően nem rendelkeznek eredendően a gyulladásgátló fenotípussal, sokkal inkább az immunsejtek által kialakított citokin-milió teszi azzá őket.

A mesenchymalis őssejtek az imént vázoltakon felül indirekt úton is képesek gátolni a citotoxikus és helper T-sejteket, ugyanis fokozzák az immunválaszt gátló, regulátor T-sejtek (Treg) osztódását és citokin termelését (TGF- β , IL-10, IL-35) is [29].

Az MSC-k másik, indirekt hatása a dendritikus sejteken (DC) keresztül érvényesül, hiszen gátolják azok differenciálódását és érését [30, 31]. Mindez azt eredményezi, hogy eltolódik a DC-elődsejt/érett-DC arány a progenitorok javára. Az éretlen dendritikus sejtek viszont az immunválaszt gátló, tolerogén alakok, amelyek a segítő és az effektor T-sejtek anergiáját és a Treg sejtek expanzióját idézik elő. Az MSC-k ezzel párhuzamosan csökkentik a dendritikus sejtek felületén expresszálódó MHC-II-es (emberben HLA-DR) antigének és kostimulátor molekulák (CD40, CD80 és CD86) expresszióját. Ezzel egyidőben gátolják a gyulladáscitokinek (IL-12 és TNF- α) termelését, ugyanakkor fokozzák az immunszuppresszív hatású IL-10 és TGF- β termelését, vagyis a dendritikus sejtek antigénbemutató és gyulladáskeltő képessége MSC-k jelenlétében erőteljesen csökken [32].

A természetes ölüsejtek is többféleképpen reagálnak a mesenchymalis őssejtek jelenlétére. Az MSC-k gátolják a frissen szeparált természetes ölüsejtek (NK sejtek) osztódását és INF- γ termelését [33], míg a preaktivált NK sejtek proliferációját már alig képesek lassítani, sőt magát a citotoxikus reakciót sem befolyásolják [34]. Ha viszont MSC-k jelenlétében 4-5 napig előaktiváljuk az NK-sejteket IL-2-vel, akkor a célsejtek hozzáadása után már csökkent citotoxikus aktivitást tapasztalunk és – egyidejűleg – kevesebb gyulladáscitokint (IFN- γ és TNF- α) termelnek a sejtek [35].

A mesenchymalis őssejtek és a B-limfociták közti kölcsönhatás funkcionális következményeiről nagyon keveset tudunk, az eredmények ebben az esetben is ellentmondóak. Corcione és mtsai [36] szerint az MSC-k gátolják az aktivált B-sejtek osztódását és ellenanyag-termelő plazmasejtté történő differenciációját. Rasmusson és mtsainak eredményei [37] viszont arra engednek következtetni, hogy a B-sejt aktiváció erősségétől függ, hogy az MSC-k gátolják vagy éppen fokozzák az ellenanyag termelést *in vitro* kultúrában.

Az MSC-k makrofágokra gyakorolt hatását csak a közelmúltban kezdték vizsgálni. Az eddigi – mindössze néhány közleményen alapuló – eredmények szerint ezek a rendkívül plaztikus sejtek MSC-k jelenlétében inkább M2-es (alternatív úton aktivált) fenotípust mutatnak, azaz elsősorban gyulladásgátló citokineket (IL-10, IL-4, IL-13, TGF- β), és a szövetregeneráció során nélkülözhetetlen vascularis endothelialis növekedési faktort (VEGF), valamint epidermális növekedési faktort (EGF) termelnek. Fagocitáló képességük is nagyobb, mint a „gyulladásos” (M1-es) makrofágoké. Az MSC-makrofág kölcsönhatás során tehát főként gyulladásgátló, a pusztuló (apoptotikus) sejteket – például neutrofil granulocitákat – hatékonyan fagocitáló és a sebgyógyulást elősegítő sejtek alakulnak ki [38].

3. Az MSC-k immunszuppressziójának in vivo bizonyítékai

Elsőként páviánokon figyelték meg, hogy MSC-k intravénás adásával növelhető az átültetett allogén bőrgraftok túlélése [15]. Csontvelő-transzplantáció során az MSC-k képesek elősegíteni a szemiallogén és allogén graftok megtapadását és esetenként túlélését is egerekben. Gátolják az akut GVHD kialakulását, illetve mérsékelik a betegség súlyosságát [39].

Kísérletes autoimmun encephalomyelitisben (EAE, az emberi sclerosis multiplex egy egérmodellje) az intravénásan vagy intraperitoneálisan beadott MSC-k elsősorban a szekunder nyirokszervekben telepednek meg, és – ha a betegség kezdeti stádiumában adják őket – hatékonyan gátolják az autoreaktív T- és B-sejtek működését. Az állatok keringésében csökken a gyulladásos citokinek mennyisége, a központi idegrendszerben kevésbé kifejezett a leukocita beszűrődés és a demielinizáció [40, 41].

MSC-vel kezelt NOD (non-obese diabetes-es) és MRL/lpr (emberi systemás lupus erythematosus modell törzs) egerekben nem, vagy csak a vártnál jóval később alakul ki az 1-es típusú diabetes, illetve az emberi systemás lupus erythematosusra (SLE) emlékeztető autoimmun betegség [42]. Kollagén indukált arthritises állatokban az MSC-kezelés csökkenti a gyulladásos citokinek termelését, és megelőzi a csont- és porckárosodást [43]. Ugyancsak gátolják az endotoxinnal (LPS- lipopoliszacharid) kiváltott lokális és szisztémás gyulladást, sőt részben a sepsist is [44, 45]. A bleomycinnel indukált tüdőkárosodás szintén megelőzhető MSC-k adásával. Az

őssejtek megakadályozzák a gyulladás és a fibrosis kialakulását a bleomycinnel kezelt egerek tüdejében, és csökkentik a szérum TNF- α és IL-1 α szintjét [46].

4. A gátlás mechanizmusa

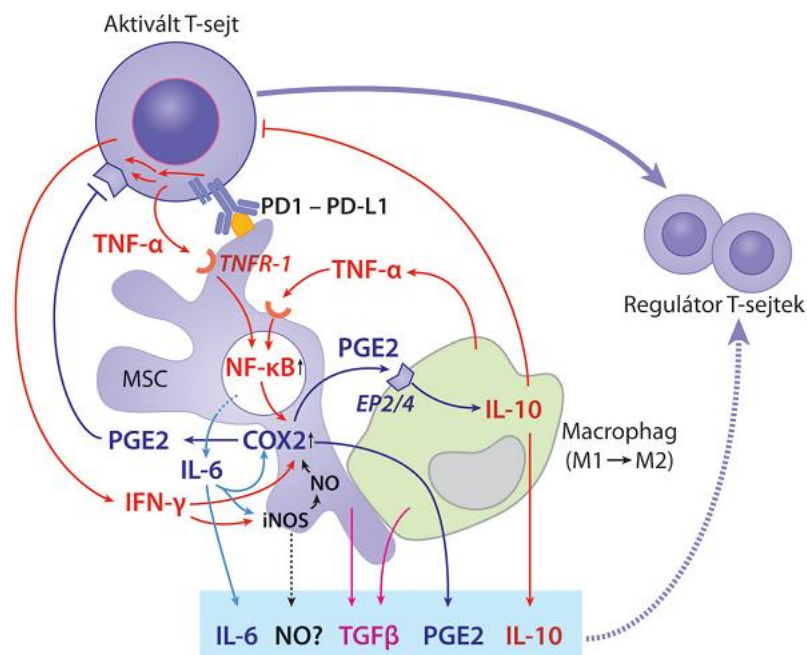
A fenti rövid – és korántsem teljes – áttekintés jól mutatja, hogy az MSC-k számos különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerben képesek kifejteni gyulladásgátló és/vagy immun-suppresszív hatásukat. A jelenség tehát jól ismert és többszörösen bizonyított is, azonban annak pontos mechanizmusát és az abban szerepet játszó faktorokat máig nem sikerült egyértelműen tisztázni. A különböző munkacsoportok más-más (részben az őssejtek felszínén kifejeződő, részben általuk szekretált) molekulák szerepét hangsúlyozzák (1. táblázat) [47].

1. táblázat: A mesenchymalis őssejtek gyulladásgátló és immun-suppresszív aktivitásáért felelős fontosabb molekulák Forrás: Hegyi Beáta, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladásos- és immun-folyamatok szabályozásában*. Immunológiai Szemle 4:(2), 4-10 (2012)

Sejt-sejt kölcsönhatásokat közvetítő molekulák	Szolúbilis faktorok	Egyéb
B7-H1 (PDL1) B7-H4 Notch receptor(ok) Jagged 1	Prostaglandin E2 Indolamin-2,3-dioxigenáz enzim Nitrogén-monoxid TSG-6 (TNF- α indukálta gén 6 által kódolt) fehérje TGF- β , HGF, IL-10 Hemoxigenáz-1 enzim IL-1 receptor antagonist SPI-6 (szerin-proteáz-inhibitor 6) Adenozin	HLA-G H-faktor

A kevés, nagy bizonyossággal kijelenthető tények egyike, hogy az MSC-k csak IFN- γ , illetve IFN- γ és valamilyen gyulladáscitokin (TNF- α vagy IL-1) egyidejű jelenlétében válnak immunszuppresszívokká. Ennek következtében viszont gátolják az aktivált T-sejtek IFN- γ termelését, vagyis negatív visszacsatolás jön létre az MSC-k és a T-limfociták között [28, 48].

Az „aktivált” MSC-k immunszuppresszív hatása pedig részben sejt-sejt kölcsönhatás(ok), részben szolúbilis mediátorok révén valósul meg. Ezek – az adott kísérleti rendszertől függően – különbözőek lehetnek, vagyis több párhuzamos, részben redundáns molekuláris mechanizmus felelős a gátlás(ok) kialakulásáért. A folyamat legfontosabb lépéseit – egy „minimális modell” formájában – az 1. ábrán foglaltuk össze. Eszerint a T-sejtek és MSC-k között, az előbbieket PD1- (Programmed cell death 1, CD279), illetve az utóbbiak PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1, CD274) molekuláinak közvetítésével jön létre közvetlen sejt-sejt kapcsolat [49]. Az érintett T-sejtek által termelt IFN- γ , valamint a részben T-limfocita, részben makrofág eredetű TNF- α együttesen indukálják a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim expresszióját az MSC-kben.



1. ábra Mesenchymalis őssejtek, T-limfociták és makrofágok kölcsönhatása.

A részletes magyarázatot lásd a szövegben Forrás: Hegyi Beáta, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladáscitokin- és immunfolyamatok szabályozásában*. Immunológiai Szemle 4:(2), 4-10 (2012)

A keletkező prosztaglandin E2 (PGE2) közvetlenül is képes gátolni az aktivált T-sejtek osztódását, de – ami ennél valószínűleg jóval fontosabb – a makrofágok EP2-es és EP4-es receptoraihoz kötődve nagy mennyiségű gyulladásgátló citokin (IL-10 és talán TGF- β) termelését indukálja, tehát az M2 fenotípus irányába tolja el a sejteket.

Az MSC-k PGE2-szintézisét az IFN- γ azzal is elősegíti, hogy az iNOS (indukált nitrogén-oxid-szintáz) enzim kifejeződését és/vagy aktivitását is fokozza az őssejtekben, a termelődő nitrogén-oxid pedig ugyancsak növeli a COX2-aktivitást. (Emellett a nitrogén-oxidnak – ha nagy mennyiségben kerül a környezetbe – szintén van közvetlen T-sejt-gátló hatása is). Ráadásul az MSC-k folyamatosan termelnek IL-6-ot, felszínükön pedig IL-6-receptorokat expresszálnak. Ez egy újabb pozitív, autokrin/parakrin visszacsatolási lehetőség a rendszerben, mivel az IL-6 is képes fokozni a Cox2 gén expresszióját. (A dendritikus sejtek valószínűleg a makrofágokhoz hasonlóan viselkednek ebben a rendszerben). A T-limfociták, MSC-k és makrofágok (vagy dendritikus sejtek) együttműködése során alakulhat ki olyan mikrokörnyezet, ami elősegíti a regulátor T-sejtek aktiválódását és osztódását [19-21, 50].

Modellünkben – részben az áttekinthetőség kedvéért nem minden, az 1. táblázatban felsorolt, MSC-k által termelt immunszuppresszív hatású anyag szerepel. Közéjük tartozik az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzim, aminek kifejeződését szintén az IFN- γ indukálja. Ez az enzim a triptofánt, a sejtek környezetében legkisebb mennyiségben előforduló esszenciális aminosavat kinureninen keresztül pikolén- és kinolénsavra bontja le. Így az IDO-t expresszáló sejt környezetében csökken az aminosav kiindulási koncentrációja, lokálisan ún. „triptofánsivatag” alakul ki. A triptofánhiány és a bomlástermékek valószínűleg együttesen gátolják a limfociták (elsősorban a Th1-es és az NK-sejtek) proliferációját. Az IDO enzim működése tehát könnyen beilleszthető modellünkbe.

Hasonló a helyzet a TSG-6 (TNF- α -indukált gén 6 által kódolt) fehérje esetén, aminek kifejeződését ugyancsak gyulladást okozó citokinek indukálják, és a 35 kD tömegű molekula gyulladásgátló hatása – legalábbis részben – a COX-2 aktivációján alapul. A többi – az 1. táblázatban szereplő – gátló faktor hatásmechanizmusáról viszont túl keveset tudunk ahhoz, hogy modellünkben elhelyezhessük őket, pedig minden bizonnyal ezek biztosítják az MSC-közvetített immunszuppresszió kétségtelenül létező alternatív útjait, azaz a rendszer redundanciáját [19-21].

5. A kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE)

A kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) az emberi sclerosis multiplex legrégebbi állatmodellje, amely kiválóan alkalmas a központi idegrendszeri gyulladással és autoimmun folyamatok vizsgálatára.

A sclerosis multiplex a felnőtt népesség leggyakoribb (1:1000) központi idegrendszeri gyulladással és mielinhüvely károsodással járó kórképe, amely főként fiatal felnőtteket érint [51]. Jellegzetességei a fokális gyulladással járó góccok kialakulása az idegszövet fehér állományában (leggyakrabban a látóideg, a periventrikuláris zóna, az agytörzs és a gerincvelő érintett), amelyet a beszűrődő immunsejtek (főként limfociták és monociták) tevékenysége nyomán mielinhüvely károsodás és ennek következményeként axonpusztulás kísér [52]. A léziók kialakulását a korai időszakban látásromlás, a test különböző pontjain jelentkező érzéketlenség vagy zsibbadás, később pedig a motoros funkciók zavarai kísérik, amelyet hosszabb-rövidebb – akár évekig tartó – tünetmentes időszak követ (relapszáló-remittáló sclerosis multiplex). Az esetek felében 10 éven belül kialakul a szekunder progresszív forma, amely remissziók nélküli, folyamatos állapot-romlással jellemezhető. A betegek 10-20%-ánál már az első tünetek megjelenését követően sem alakul ki remisszió, ekkor primer progresszív sclerosis multiplexről beszélhetünk.

A betegséget kiváltó tényezők és a patomechanizmus nem tisztázottak pontosan. Jelen tudásunk szerint – a főként bizonyos HLA allélokhoz köthető – öröklött hajlamon felül környezeti tényezők (pl. vírusfertőzések, életmódbeli szokások) is jelentősen hozzájárulnak a sclerosis multiplex kialakulásához [53]. Máig nem eldöntött kérdés azonban, hogy a központi idegrendszerből vagy a perifériáról indul-e ki a betegség. Az egyik álláspont szerint az oligodendrocyták – eddig tisztázatlan okokra visszavezethető – pusztulása miatt a perifériára kerülő antigének lobbantják be az autoimmun folyamatokat. A másik elgondolás szerint bizonyos külső behatások vagy környezeti tényezők autoreaktív T sejt klónok keletkezését indukálják, ami ezután oligodendrocyta pusztuláshoz és a kórkép tüneteinek megjelenéséhez vezet. Azonban tény, hogy a betegség egy bizonyos szakaszában az autoimmun gyulladással járó folyamatok jelentős szerepet kapnak. A betegség ezen aspektusát modellezi a kísérletes autoimmun encephalomyelitist (EAE).

Az EAE-t központi idegrendszerből származó antigének (pl. mielin oligodendrocyta glikoprotein (MOG), mielin bázikus fehérje (MBP), proteolipid protein (PLP), vagy agyi homogeniátum) és komplett Freund adjuváns (CFA) segítségével (aktív indukció), vagy már beteg állatból vett autoreaktív T sejtek átvitelével (passzív indukció) idézhetjük elő [54, 55]. Aktív indukció esetén pertussis toxin alkalmazása is szükséges, amely a vér-agy gát integritásának megbontása révén hozzájárul az immunsejtek központi idegrendszerbe jutásához és a T sejt tolerancia megszűnéséhez [56].

Kutatási eredmények tanulsága szerint ebben a modell-rendszerben (a sclerosis multiplexhez hasonlóan) különféle immunsejtek együttműködése szükséges a betegség kialakulásához és súlyosbodásához. Az EAE indukciójában a perifériás nyirokszervekben felszaporodó, a bejuttatott mielinhüvely eredetű antigénekre specifikus, autoreaktív, CD4+ T sejt klónok kitüntetett jelentőségűek. Ezek a T limfociták – a pertussis toxin hatására megnyílt – vér-agy gáton átlépve a központi idegrendszerbe kerülnek, ahol a helyi antigén prezentáló sejteken bemutatott mielin fehérje alkotóelemek aktiválják azokat [56]. Az IFN- γ termelő (Th1) és az IL-17 szekretáló (Th17) helper T sejtek, az ellenanyag termelő B limfociták, valamint a makrofágok is fontos szerepet játszanak az EAE patogenezisében. Ezt az is jelzi számunkra, hogy az összes említett sejtípust megtaláljuk a fehérállományban megjelenő gyulladós gócokban. Az autoreaktív folyamatok megfékezését és szabályozását többek között FoxP3+ regulátor T sejtek végzik, amelyek vélhetően az akut bénulási fázist követő spontán remisszió kialakulásához is hozzájárulnak [57].

Az EAE patogenezisében a perifériáról beáramló immunsejteken felül az idegszövet specializálódott mononekleáris fagocitái, a mikroglia sejtek is fontos szerepet játszanak, hiszen kétélű kardként viselkedve egyaránt részt vesznek a központi idegrendszeri gyulladós és regenerációs folyamatokban. Egyfelől a betegség kezdeti szakaszában különféle proteázok, szabadgyökök és gyulladós citokinek termelésével fokozzák a neuronok és oligodendrocyták pusztulását. Később azonban neurotrofikus faktorok termelésével, a felhalmozódott sejtörmelékek eltakarításával és a remielinizáció támogatása révén a regeneráció megindulását mozdítják elő [58].

6. A mikroglia sejtek

A mikroglia sejteket egyfelől a központi idegrendszer gliasejt állományához tartoznak, másrészt pedig a gyulladáshoz és immunfolyamatokban szerepet játszó, haematopoietikus eredetű mononukleáris fagocita rendszer részét képezik [59]. Ezek a sejtek különösen kényes feladato(ka)t látnak el a központi idegrendszerben. Mivel az érett neuronok nem képesek osztódni és nem – vagy legfeljebb csak részben – pótlódnak, ezért a gyulladáshoz tartozó folyamatok féken tartása mellett úgy kell megvédeni azokat a patogénektől, hogy maguk az idegsejtek ne károsodjanak. Másfelől viszont sérülést követően a gyulladás igen előnyös is lehet, hiszen elősegíti a regenerációs folyamatok beindulását, tehát teljes kiiktatása is káros lenne. Éppen ezért a mikroglia sejtek feladata, hogy megteremtsék az arany középutat, vagyis elindítsák és szabályozzák a még nem kóros, de már hatékony mértékű immunválaszt a központi idegrendszerben. Emellett homeosztatis és javító feladatokat is ellátnak, hiszen ezek a sejtek felelősek az agyban gyakorta előforduló mikrosérülések kijavításáért, ami magában foglalja a szinaptikus kapcsolatok „újra-huzalozását”, neurotrofikus faktorok termelését, a kapilláris hálózat helyreállítását, és a sérült vagy elpusztult sejtek törmelékeinek eltakarítását is [60].

Eredetük hosszú ideig kiélezett szakmai vita tárgyát képezte: egyesek neuroektodermális [61], mások mezodermális [62] sejtípusnak vélték őket, sőt abban sem volt egyetértés, hogy az ontogenezis mely szakaszában különül el a fejlődésük. A legújabb, „lineage tracing” technikán alapuló megfigyelések tanulsága szerint egerekben a felnőtt szervezet mikroglia sejtjei a szikzacskó falában ülő primitív mieloid elődsejtekből származnak. Ezek a sejtek egerekben az embrionális fejlődés 8. napja táján különülnek el és a 9. napon, az érhálózat kialakulása után vándorolnak be a központi idegrendszerbe [63]. Ennek értelmében a mikroglia sejtek az ontogenezis során a többi szöveti makrofágtól eltérően, a definitív vérképzéstől függetlenül alakulnak ki. Ezt az elképzelést támasztja alá az a tény is, hogy ezek a sejtek központi idegrendszeren belül elzárt, lokális önmegújulásra képes populációt alkotnak. Mindezek ellenére azonban fontos hangsúlyozni, hogy a mikroglia sejtek habár fejlődésük igen korán elkülönül, mégis mieloid eredetűek és a mononukleáris fagocita rendszer részét

képezik, tehát viselkedésük és szerepkörük (némi szövetspecifikus vonás ellenére is) összevethető más szöveti makrofágokéval.

A mikroglia sejtek két, egymástól élesen elkülönülő sejtmorfológiát vehetnek fel, ami pontosan jelzi aktiváltsági állapotukat is. Az egészséges központi idegrendszerben a hagyományos nomenklatúra szerint „nyugvó” formának nevezett sejtalakokat találhatunk, amelyek kis sejttesttel és sugárirányú, esetenként elágazó, nagy felületű nyúlvány-rendszerrel jellemezhetőek. Nyúlványaikkal a szomszédos mikroglia sejtek hasonló nyúlványai felé törekednek, így együttesen egy, a teljes központi idegrendszert átívelő hálózatot hoznak létre [64]. A „nyugvó” jelző azonban nem a legmegfelelőbb és semmi esetre sem jelent mozdulatlanságot, hiszen ezek a sejtek nyúlványaikkal folyamatosan és intenzíven pásztázzák környezetüket [65], olyannyira, hogy egyes becslések szerint átlagosan 4-5 óránként az agy teljes térfogatát „átvizsgálják” [66].

A sérült vagy fertőzésnek kitett központi idegrendszerben a mikroglia sejtek morfológiája jelentősen megváltozik, amit „aktivált” formának nevezünk, ekkor a sejttest kiterül, amőboid alakot ölt és a nyúlványok is jelentősen megrövidülnek. A morfológiai változáshoz a mieloid markerek expressziójának megemelkedése és a fagocitáló képesség növekedése is társul. Ezek a helyváltoztató mozgásra képes, amőboid alakok morfológiai értelemben teljességgel megkülönböztethetetlenek a szervezet bármely más részén előforduló makrofágoktól [64]. Ez félreértésekre és bizonytalanságra ad okot, hiszen a központi idegrendszeri sérülések helyén található, makrofág-szerű sejtekről morfológiai alapon képtelenség eldönteni, hogy az ottani mikroglia állományból eredeztethetők-e vagy - a vér-agy gát megnyílását követően - a keringésből beáramló monocitákból származnak.

Korábban, főként morfológiai eredmények alapján csak ez a két végállapot (nyugvó vs. aktivált forma) volt ismert. Újabban azonban, molekuláris vizsgálati eredmények alapján úgy tűnik, hogy – makrofágokhoz hasonlóan – mikroglia sejtek esetén is többféle aktivált állapot létezik: leggyakrabban az M1 (klasszikus úton aktivált) és M2 (alternatív úton aktivált) formát szokás megkülönböztetni.

Makrofágokon végzett kísérletek során vált nyilvánvalóvá, hogy a sejt aktuális állapota és az aktivációt kiváltó behatás milyensége döntően befolyásolja a válaszreakció kimenetelét [67]. Klasszikus (M1) aktivációt intracelluláris patogén fertőzés esetén láthatunk, ha a makrofág 1-es típusú helper T (Th1) sejtek által termelt

citokinekkel (TNF- α és/vagy IFN- γ) találkozik, valamint Toll-like receptoron keresztül éri stimulus. Ez esetben válaszként megnő az IL-12 és IL-23 citokinek szekréciója, fokozódik a reaktív oxigén- és nitrogén-gyökök termelése és az antigén prezentációban kulcsfontosságú sejt felszíni molekulák (MHC-II és a kostimulátor CD80, CD86) expressziója is. Vagyis a klasszikus (M1) aktiváció során a makrofágok gyulladást keltő fenotípust vesznek fel és immuneffektor sejtekként viselkednek [68].

Az M2-es vagy alternatív aktivációt eredendően a Th2-es sejtek által termelt IL-4-nek kitett makrofágokon írták le, amelyek erre fokozott mannóz receptor expresszióval reagáltak [69]. Azóta tudjuk, hogy az M2-es makrofág többek között fokozott IL-10 és argináz expresszióval is jellemezhető, tehát ez a forma az előbbivel ellentétben gyulladásgátló, immunválasz-szabályozó és regenerációt támogató funkciókat lát el.

Újabban az is nyilvánvalóvá vált, hogy az M2 formát a betöltött funkció szerint több altípusra lehet osztani. Egyes elképzelések szerint két, eltérő feladattal rendelkező formát különíthetünk el: egyik a sebgyógyulást és szövetregenerációt támogató forma, másik a szerzetten deaktivált vagy regulátor típus (jellegzetességeiket lásd a 2. táblázatban). Kutatási eredmények szerint ugyanazon makrofág képes a bármely aktiváltsági állapot elérésére, a kimenetel csak attól függ, hogy milyen aktiváltsági állapotban volt korábban és milyen stimulusok érik aktuálisan [70]. Az elhatárolás természetesen nem éles, a csoportok között folytonos az átmenet, hiszen a sejtet érő stimulus és a lokális mikrokörnyezet hatására az egyes formák dinamikusan átalakulhatnak egymásba. Éppen ezért a legszemléletesebben egy színátmenetes kör-diagrammal ábrázolhatjuk a makrofágok különféle aktiváltsági állapotait (2. ábra).

A perifériás szöveti makrofágokkal szemben a központi idegrendszeri mikroglia sejtek esetében nem ennyire egyértelműen tisztázottak a különböző aktiváltsági formák és az azokat szabályozó mechanizmusok sem. Az eddigi eredmények alapján arra következtethetünk, hogy a mikroglia sejtek is több, funkcionálisan eltérő fenotípust és aktiváltsági formát ölthetnek, amelyek párhuzamba állíthatók a makrofágok esetén leírt M1/M2 formákkal [71, 72]. Ez azt is jelenti egyben, hogy a mikroglia sejtek aktuális állapotának meghatározó szerepe lehet a központi idegrendszeri kórképek kialakulásában és kimenetelében.

Éppen ezért az aktiváltsági állapotot kedvezően befolyásoló terápiás eljárások jótékonyan befolyásolhatnak olyan neurodegeneratív betegségeket, mint pl. a sclerosis multiplex.

2. táblázat: A makrofágok különféle aktiváltsági állapotai, amelyeket extrapolációval a mikroglia sejtekre is alkalmazhatunk Forrás: Boche, D., Perry, V.H., and Nicoll, J.A. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 3-18. alapján, módosítva

	M1 (klasszikus úton aktivált) forma	M2 (alternatív úton aktivált) regeneratív vagy sebgyógyulást támogató forma	M2 (alternatív úton aktivált) regulátor vagy gyulladásgátló forma
Stimulus	IFN- γ , TNF- α	IL-4, IL-13	IL-10, glükokortikoidok
Forrás	NK sejtek, Th1 limfociták	granulociták, Th2 limfociták	makrofágok
Termelt faktorok	gyulladásos citokinek (IL-1 β , TNF- α , IL-6, IL-23) és reaktív gyökök	extracelluláris mátrix komponensek argináz 1, kitináz	TGF β 1, IL-10
Sejtfelszíni fehérjék	MHC-II ?	Mannóz receptor (CD206)	
Funkciók	mikroorganizmusok elpusztítása, fagocitózis, antigén prezentáció, járulékos károkat okozhat a szervezet sejtjeiben	szövetregeneráció és sebgyógyulás elősegítése, fagocitózis, extracelluláris mátrix komponensek termelése és a mátrix újra szervezése	gyulladásgátlás fagocitózis

Klasszikus M1

↑ MHC-II,
↑ B7,
↑ iNOS,
↑ IL-12,
↑ TNF- α ,
+ APC,
Th1 válasz



Regulátor M2

↑ MHC-II,
↑ CD86,
↑ iNOS,
↓ IL-12,
↓ TNF- α ,
↑ IL-10,
++ APC,
Th2 válasz
Gyulladásgátlás

Alternatív M2

↓ MHC-II,
↓ CD86,
↓ iNOS,
↓ IL-12,
↓ TNF- α ,
↑ IL-10,
↑ Argináz,
- APC,
Sebgyógyulás,
regeneráció

2. ábra: A makrofágok különféle aktiváltsági állapotai

Célkitűzések

Jelen munkánkban a következő kérdésekre szerettünk volna választ kapni:

- 1) Izolálhatók-e a csontvelőből ismert MSC-khez hasonló őssejtek más testtájáról, úgymint hasi zsírszövetből, a thymusból, a lépből és az aortából is?
- 2) A különböző szervekből származó MSC-k hasonló immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek-e?
- 3) Milyen szolúbilis jelátvivő anyagok játszanak szerepet az MSC-k immunszuppresszív aktivitásában?
- 4) Hogyan befolyásolják a legfontosabb gyulladásos citokinek – TNF- α és IFN- γ - a mesenchymalis őssejtek PGE2 termelését?
- 5) Milyen egyéb mechanizmusok játszanak szerepet a mesenchymalis őssejtek PGE2 termelésének szabályozásában?
- 6) Alkalmasak-e az MSC-k a kísérletes autoimmun encephalomyelitis kezelésére?
- 7) Az MSC-k jelenléte hogyan befolyásolja a mikroglia sejtek morfológiáját, fagocitózisát, citokin termelését illetve antigén prezentáló képességét, azaz aktiváltsági állapotát (polarizációját)?
- 8) Bakteriális endotoxin (LPS) jelenléte hogyan befolyásolja az MSC-k mikrogliaira gyakorolt hatását?
- 9) Milyen jelátviteli rendszerek játszanak szerepet a mesenchymalis őssejtek és mikroglia sejtek kölcsönhatásában?

Módszerek

1. Kísérleti állatok

Kísérleti állataink felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6 (H-2^b), Balb/c (H-2^d) (Országos Onkológiai Intézet, Budapest), valamint újszülött (1-3 napos) CD1 (MTA, Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest) egerek voltak. Az újszülött (1-3 napos) CX3CR1^{+/GFP} transzgenikus C57Bl/6 állatokat Dr. Kovács Krisztina (MTA, Kísérletes Orvostudományi Kutatóintézet, Budapest) bocsátotta rendelkezésünkre.

2. Mesenchymalis ősz-/stroma sejtek izolálása és tenyésztése

A mesenchymalis őssejtek izolálását és tenyésztését laboratóriumunkban a Peister és mtsai [73] által kidolgozott módszer alapján, a korábban leírt [74] módon végeztük. Röviden: az állatokból combcsontokat izoláltunk, majd végeik eltávolítása után fecskendőbe felszívott médiummal fújtuk ki belőlük a csontvelőt. Az így kapott sejtszuszpenziót 60 µm-es pórusméretű nylon filteren szűrtük át, eltávolítva ezzel a nagyobb szövettörmelék darabokat. A kinyert sejteket Hanks-féle sóoldattal (Invitrogen, Carlsbad, CA) mostuk és négyzetcentiméterenként 2-5x10⁶ sejt számban 25 cm²-es tenyésztőedényekbe (BD Falcon, Bedford, MA) szélesztettük őket. A tenyésztéshez Dulbecco-által módosított Eagle-féle médium (DMEM) és Ham-féle F-12 médium 1:1 arányú keverékét használtuk, 10 % v/v foetalis borjú savóval (FCS), 5 % v/v lósavóval (HS), 2 mM L-glutaminnal (mind Invitrogen), 50 U/ml penicillinnel, és 50 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo) kiegészítve (komplett médium). A hasi és ágyéki zsírszövet mintákat hideg foszfáttal-pufferelt sóoldatban (PBS) mostuk, majd mechanikai feltárást követően 0.1% kollagenáz (Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, USA) tartalmú PBS-ben, 37°C-on emésztettük 30 percen át. Ezután centrifugálással távolítottuk el a kötőszöveti elemeket és az érett zsírsejteket, majd az üledéket komplett médiumban, az előzőekben leírtak szerint szélesztettük. A tenyészeteket 37°C-on CO₂-termosztátban inkubáltuk és a le nem tapadt sejteket a médium heti kétszeri cseréjével távolítottuk el.

Az összefüggő, adherens sejtréteget az átoltás előkészítéseként hideg Hanks-féle oldattal mostuk, majd 0.25%-os tripszin/EDTA oldattal választottuk el a tenyésztőedény falától. Újbóli mosás után nagyobb, 75-cm²-es flaskába (BD Falcon) szélesztve

folytattuk a tenyésztést. A további átoltásokat is a fent leírtak szerint végeztük el. Kísérleteinkhez 8-15-ször átoltott MSC-eket használtunk.

3. A mesenchymalis stroma sejtek differenciálata

Az őssejtek osteoblast és adipocytá irányú differenciálataát Pittenger és mtsai [5] módszerével végeztük. A csont irányú differenciálata során a sejteket 2 hétig inkubáltuk dexametazont (10^{-8} M), β -glicerofoszfátot (10 mM), és aszkorbinsavat (50 μ g/ml) tartalmazó, 10% FCS-sel kiegészített DMEM médiumban. A differenciálatai periódus végén az ezidő alatt lerakódott extracelluláris kalciumot alizarinvörös festékkel tettük láthatóvá. A zsírsejt irányú differenciálataához az FCS tartalmú DMEM médiumhoz dexametazont (10^{-7} M) és 3-izobutil-1-metilxanthint (0,5 mM) adtunk, majd 7 nap elteltével a sejtekben felhalmozódott lipidcseppeket olajvörös festékkel jelöltük meg (mind Sigma-Aldrich). A képek Olympus CK2-es inverz mikroszkóppal (Olympus, Tokió, Japán) és Nikon Coolpix 4500 digitális kamerával (Nikon GmbH, Düsseldorf, Németország) készültek.

4. Áramlási citometria

A sejt felszíni markerek vizsgálatához mintánként $2-5 \times 10^5$ sejtet tettünk FACS készülékben való mérésre alkalmas műanyag csövekbe, majd kétszeri PBS-es mosást követően megjelöltük fluorescein izotiocianáttal (FITC) (anti-CD34, anti-CD90.2 és anti-F4/80), fikoeritrinnel (PE) (anti-Sca-1, anti-CD44, anti-CD73 és anti-CD206), allofikocianinnal (APC) (anti-CD86) vagy biotinnal (anti-CD3, anti-CD45R/B220, anti-CD11b, anti-Ly-6G, és anti-TER-119) konjugáltatott egér monoklonális ellenanyagokkal (BD Pharmingen, San Diego, CA). A sejteket 20 percig 4°C -on inkubáltuk, majd újból kétszer mostuk PBS-sel. Ezt követően a biotinált ellenanyagokkal jelölt sejtekhez második reagensként PE-vel konjugáltatott Streptavidint (Sigma-Aldrich) adtunk. Az MHC-II molekulák kimutatását M5/114.15.2 monoklonális patkány anti-egér IgG2b-vel (*Dr. László Glória*, ELTE Immunológiai Tanszék, ajándéka) és poliklonális, FITC-cel jelzett nyúl anti-patkány IgG-vel (BD Pharmingen) végeztük. A második ellenanyaggal ismételtén 20 percig, 4°C -on történt az inkubálás, majd PBS-sel való mosás után a méréseket FACScan áramlási

citométerrel, CellQuest szoftver segítségével végeztük (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ).

5. T-sejtek tisztítása

A T-sejtek tisztítását SpinSep Mouse CD3⁺ T Cell Enrichment kittel, a gyártó utasításait követve végeztük (StemCell Technologies Inc, Vancouver, Kanada). Röviden: felnőtt (10-12 hetes), C57Bl/6 egerek lépét izoláltuk, majd kétszeri Hanks-féle oldattal történt mosást követően a szövetet mechanikailag feltártuk. Centrifugálás után 5% patkánysavó tartalmú médiumban 5×10^7 milliliterenkénti sejtszámú szuszpenziót készítettünk. Ezután egy több lépésből álló folyamat során specifikus ellenanyag koktél segítségével vasgyöngyökkel jelöltük meg a CD3⁺ T-sejtek kivételével minden, a lépben előforduló sejtípust. Ezt követően a sejtsuszpenziót négyszeresére hígítottuk, majd sűrűség-gradiens (StemCell Technologies Inc) centrifugáltuk. A jelölésnek köszönhetően a két, különböző sűrűségű folyadékréteg határfelületéről nagy tisztaságú (> 95%) T-sejt preparátumot izoláltunk.

6. T-sejt proliferáció gátlása

Az immunszuppresszív aktivitás vizsgálatához (az Eredmények részben feltüntetett számú) mesenchymalis őssejtet tapasztottuk ki 100 µl komplett médiumban, 96 lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákra (BD Falcon). 24 óra múlva a nem adherens sejteket lemostuk és minden lyukhoz 2×10^5 lépsejtet, vagy izolált lép T-sejtet adtunk 200 µl végtérfogatban, lósavó mentes komplett médiumban, 5 µg/ml concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich) egyidejű jelenlétében, vagy ConA nélkül.

A kevert limfocita kultúrákat (MLR) hasonló tenyésztési körülmények között, 2×10^5 responder (C57Bl/6) és 2×10^5 stimulátor (30 Gy-vel besugárzott Balb/c) lépsejt összemérésével készítettük el. Két, vagy MLR esetén négy nap inkubáció után 1 µCi ³H-timidinnel (Amersham Pharmacia Biotech Export GmbH, Bécs, Ausztria) 6 órán keresztül jelöljük a sejteket, majd learatásukat követően folyadékszcintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot.

A „trans-well” elrendezésű kísérletek során 2×10^5 MSC-t szélesztettünk komplett médiumban 24 lyukú tenyésztőtálcákra, majd 2×10^6 T sejtet adtunk hozzájuk az adott tenyésztőtálcához illő betét-kamrákban, amelyek alját 1 µm pórusátmérőjű

féligáteresztő hártya alkotja (BD Falcon). Ez a megoldás térben ugyan szeparálja egymástól a sejteket (kizárva ezzel a közvetlen sejtkontaktust), de meghagyja annak lehetőségét, hogy a tenyésztőközeg útján az 1 μm átmérőnél kisebb szolubilis mediátorok révén a két sejttípus hatást fejthessen ki egymásra.

7. Szekretált fehérjék kimutatása sejt kultúra felülúszókból

A különböző sejt kultúra felülúszókban, valamint szérumban mintákban található citokinek mennyiségét minden esetben az adott citokinre specifikus, kvantitatív Parameter™ ELISA Kit (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA) segítségével, a cég utasításait követve mértük meg.

8. A mesenchymalis őssejtek in vitro stimulációja

Az MSC-eket 2×10^5 sejt számban, 1 ml komplett médiumban 24 lyukú, lapos fenekű tenyésztő tálcákra (BD Falcon) szélesztettük, majd 24 órán keresztül $37\text{ }^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk őket. A le nem tapadt sejteket a táptalaj cseréjével távolítottuk el, majd a gyulladáscitokinek (TNF- α és IFN- γ ; R&D Systems, Inc), enzim-gátlószerek (Indometacin, L-NMA és metil-triptofán, Sigma-Aldrich) nitrogén-oxid donor molekula (NOC-18; Sigma-Aldrich) és/vagy lipopoliszacharid (LPS; Sigma-Aldrich) hozzáadása után további 48 órán keresztül tenyésztettük a sejteket. A felülúszókból az inkubációs idő letelte után 500 μl térfogatú mintákat vettünk, amelyeket ezt követően a szekretált fehérjék kimutatásáig $-80\text{ }^\circ\text{C}$ -ra fagyasztva tároltuk.

9. A kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) betegségmodell indukciója és követése

Fiatal felnőtt (12 hetes) nőstény C57Bl/6 egereket a vizsgálat megkezdése előtti, 0. napon 5 mg/ml elölt Mycobacterium tuberculosis (Difco Laboratory, Detroit, USA) tartalmú komplett Freund adjuváns (CFA) (Sigma-Aldrich) valamint 1 mg/ml MOG₃₅₋₅₅ peptid (mielin oligodendrocita glikoprotein) (Dr. Tóth Gábor, SZTE ÁOK Orvosi Vegytani Intézet) tartalmú PBS oldat 1:1 arányú keverékével oltottuk a két hátsó végtag belső oldalán), oldalanként 0,1 ml keveréket injektálva a bőrfelszín alá (subcutan). A MOG₃₅₋₅₅ peptid szekvenciája a következő volt: MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK.

Az indukció napján, valamint 2 nap elteltével az állatoknak 0,1 ml PBS-ben oldott 330 µg Pertussis toxint (List Biological Laboratories, Campbell, USA) is beadunk intraperitoneálisan. Az állatokat a 7. napon véletlenszerűen két csoportra osztottuk. Az egyik csoport 0,2 ml 2×10^6 mesenchymalis össejtet tartalmazó Hanks-féle oldatot kapott intraperitoneálisan (kezelt állatok), míg a másik csoportot csak Hanks-féle oldattal oltottuk be (kezeletlen egyedek).

A kísérletek 28 napig tartottak, ez idő alatt az állatok egészségi állapotát minden nap ellenőriztük. A betegség súlyosságát egy 5 fokozatú skálán pontoztuk az alábbiak szerint:

- 0 pont: egészséges állat, farkát vízszintes helyzetig felemeli járás közben;
- 1 pont: az állat lebénult farkát járás közben maga után húzza, már nem képes felemelni azt;
- 2 pont: az állat hátsó lábainak mozgása „botladozóvá”, bizonytalanná válik vagy az egyik hátsó végtagja bénult;
- 3 pont: az állat mindkét hátsó végtagja lebénult, nem képes mozgatni azokat;
- 4 pont: az állat mellső lábainak mozgása is bizonytalanná válik, nehezen tudja testét emelni az aljzatról vagy az egyik mellső végtagja bénult;
- 5 pont: az állat minden végtagja bénult vagy az állat elhalálozott.

A 4 ponttal jellemezhető állatokat túllátással kíméltük meg a további szenvedéstől. Az állatkísérletek az Országos Gyógyintézeti Központ Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága által előírt szabályok szerint, az Európai Unió 86/609/EC ajánlásában megfogalmazottak figyelembe vételével folytak.

10. Kevert glia kultúrák készítése és a mikroglia sejtek izolálása

A kevert glia kultúrák készítése és a mikroglia sejtek izolálása során Saura és munkatársai [75] nyomán, a korábban leírtak [76] szerint jártunk el. Újszülött (P1-P3) CD1 egerek agyvelejét izoláltuk, majd kétszeri PBS-es mosást követően sztereomikroszkóp alatt eltávolítottuk az agyhártyákat és a plexus chorioideust is. Ezután steril penge segítségével először mechanikailag tártuk fel a szövetet, majd 0,05% tripszin és 400 µg/ml DNáz (Sigma-Aldrich) tartalmú PBS-ben enzimatikusan is emésztettük azt (10 percig, 37°C-on). Az ily módon nyert sejteket poly-L-lizinnel (PLL) (Sigma-Aldrich) bevont Petri csészékbe (BD Falcon) szélesztettük az MSC-k

tenyésztése során is használt komplett médiumban. A le nem tapadt sejteket a tenyésztés 24. és 48. órájában a csésze felszínének alapos mosásával távolítottuk el. Az így nyert sejt kultúrát ezt követően 3 hétig tenyésztettük, heti kétszer médiumot cserélve.

Az érett kevert glia kultúrából a tenyésztés 21. napján mikroglia sejteket izoláltunk. A tenyészeteket 2 órán keresztül 0.05%-os EDTA mentes tripszin oldatban inkubáltuk 37°C-on, aminek hatására egy zömmel csak asztroglia sejteket tartalmazó réteg válik el a Petri csésze falától. Ennek eltávolítása után a letapadva maradt sejteket kétszer megmostuk PBS-sel, majd 10 percig 37°C-on inkubáltuk 0.25%-os tripszin/EDTA oldatban. Az ily módon szelektíven izolált mikroglia sejteket mosás és centrifugálás után (a kísérlettől függően) az eredmények részben feltüntetett számban PLL-el bevont felszínre tapasztottuk ki.

11. Mikroglia sejtek morfológiai analízise (immuncitokémia)

10^5 mikroglia sejtet inkubáltunk 37°C-on 48 órán keresztül 10^4 csontvelői eredetű MSC és/vagy 10 µg/ml LPS jelenlétében vagy a nélkül. Ezt követően 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal 20 percen keresztül fixáltuk a tenyészeteket, majd háromszori mosást követően felhasználásig azidos PBS oldatban tároltuk őket. Az immunfestés során a sejteket egy éjszakán át 4°C-on biotinált Isolectin B₄ (Sigma-Aldrich) 1:500 arányban 5% FCS tartalmú PBS-ben hígított oldatával inkubáltuk. PBS-es mosást követően a fluorescens detektálás előkészítéseként Alexa 488-cal konjugáltatott avidint (Invitrogen) adtunk a sejtekhez 1:1000 hígításban, majd egy óra elteltével PBS-sel mostuk. A preparátumokat bisz-benzimidet (Sigma-Aldrich) tartalmazó Mowiolal (Merck KGaA, Darmstadt, Németország) fedtük le. Mintánként (n=4) 15 egymástól független, random látótérrel készítettünk felvételeket Nikon A1R konfokális lézer-szkenning mikroszkóp (Nikon) 20-szoros objektívjével. Az elkészült felvételeken a sejtszámot a bisz-benzimiddel kékre festődött magok számolásával határoztuk meg, míg az egyes sejtek területét Zeiss AxioVision 4.8 szoftver segítségével mértük meg.

12. Mikroglia sejtek élesztő és apoptotizáló thymocyta fagocitózisának vizsgálata

Előkészületként a *Saccharomyces cerevisiae* sejteket harminc perces forralással előltük, majd a sejtszámot 5×10^7 /ml-re állítottuk be PBS-ben és az elkészült szuszpenziót felhasználásig 4°C-on tároltunk. Ebből a törzsoldatból mértünk 0,1 ml-t (vagyis 5×10^6 élesztősejtet) a mikroglia sejteket és/vagy MSC-eket tartalmazó lyukakba, majd egy órán keresztül inkubáltuk őket 37°C-on. Ezt követően Pasteur-pipetta segítségével háromszori alapos PBS-es mosással eltávolítottuk a be nem kebelezett élesztősejteket, majd 8%-os formalin oldattal 10 percig fixáltuk a mintákat. Újabb háromszori PBS-es mosást követően a preparátumokhoz Giemsa oldatot adtunk, amelyben 1 órán keresztül festődtek a sejtek. Az utolsó három PBS-es mosást követően Olympus CK2-es inverz mikroszkóp 20-szoros nagyítású objektívvel (Olympus), Nikon Coolpix 4500 digitális kamera (Nikon GmbH) segítségével mintánként 10 egymástól független, random látótérről készítettünk fényképfelvételeket. A fotókon ezután leszámoltuk a 100-100, egymástól független sejt által bekebelezett élesztő partikulumokat, majd a kapott eredményeket átlagoltuk és statisztikai analízisnek vetettük alá.

Az apoptotizáló thymocyták fagocitózisának vizsgálatához felnőtt C57Bl/6 egerek thymusát izoláltuk, majd kétszeri PBS-es mosást követően a szervet mechanikailag feltártuk. A sejteket centrifugálás után megszámloltuk, és a milliliterenként 5×10^6 számú thymocytát tartalmazó szuszpenzióhoz 1 μ M dexametazont (Sigma) adtunk, majd 12 órás 37 °C-on történt inkubálás után kétszer mostuk őket.

Az élesztő sejtek és apoptotizáló thymocyták fagocitózisát követő citokin termelésbeli változások vizsgálatához 24 lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon a mikroglia sejteket és/vagy MSC-eket tartalmazó lyukakba 5×10^6 élesztő sejtet vagy apoptotizáló thymocytát mértünk, majd egy órán keresztül inkubáltuk őket 37°C-on. Háromszori alapos PBS-es mosást követően 1 ml komplett médiumot a sejtekhez és további 48 órán keresztül tenyésztettük őket. A felülúszókból az inkubációs idő letelte után 500 μ l térfogatú mintákat vettünk, amelyeket ezt követően a szekretált fehérjék kimutatásáig - 80 °C-ra fagyasztva tároltunk.

13. Mikroglia sejtek antigén prezentáló képességének mérése

Az ovalbumin specifikus T sejtek izolálásának előkészítéseként 10-12 hetes C57Bl/6 egereket oltottunk komplett Freund adjuváns (Sigma-Aldrich) és 2 mg/ml koncentrációjú ovalbumin (Sigma-Aldrich) oldat 1:1 arányú keverékével. Az oltóanyagot a hátsó végtag külső felszínén subcutan jutattuk be. Egy hét elteltével az ily módon előkezelt állatok megduzzadt nyirokcsomóit izoláltuk, majd kétszeri PBS oldattal történt mosás után Hanks-féle oldatban fecskendő segítségével mechanikailag feltártuk azokat. Centrifugálást követően a komplett médiumban reszuszpendált T limfocitákat az Eredmények részben feltüntetett számban adtuk hozzá a mikroglia sejteket (mint antigén prezentáló sejteket) és mesenchymalis őssejteket is tartalmazó kultúrákhoz. 4 napos inkubáció után 1 μCi ^3H -timidin (Amersham Pharmacia Biotech Export GmbH) hozzáadásával 6 órán keresztül jelöltük a sejteket, majd learattuk őket és folyadék-szcintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot.

14. A regulátor T-sejtek arányában bekövetkező változások vizsgálata

A kísérlet során 2×10^5 (az előző részben feltüntetett módon) *in vivo* ovalbuminnal előaktivált T-sejtet és 2×10^5 mikrogliait tettünk sejt kultúrába 6 lyukú tenyésztőtálcákon, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ovalbumint tartalmazó komplett médiumban, 2×10^4 MSC jelenlétében vagy a nélkül. A tenyészeteket 4 napig inkubáltuk 37°C -on, majd Hanks-féle oldatos mosással eltávolítottuk a le nem tapadó limfocitákat az adherens (MSC és mikroglia) sejtek mellől. A $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ regulátor T-sejtek (Treg) jelölését a Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #1 (eBioscience Inc., San Diego, CA) segítségével végeztük el, a gyártó utasításait követve. Az ily módon jelölt sejtek mérését FACScan áramlási citométerrel végeztük és eredményeinket CellQuest szoftver segítségével értékeltük ki (Becton Dickinson Company).

15. Géntermékek kimutatása mRNS szinten, kvantitatív real-time PCR-rel

A mikroglia és MSC sejtek kultúrákba kerülését, illetve az LPS kezelést követő 5. órában a tenyészeteket PBS-sel lemostuk, majd a feltáráshoz Trizol reagenst használtunk (Invitrogen), követve a gyártó utasításait. Az RNS-ek izolálásához és

tisztításához GeneAid Total RNA mini Kit-et használtunk (New Taipei, Tajvan) a termékhez mellékelt protokoll szerint eljárva. Az RNS preparátumok tisztaságát Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) spektrofotométerrel ellenőriztük és ezzel egy időben koncentrációjukat is meghatároztuk. Az RNS mintákból 150 ng-ot írtunk át cDNS-re High-capacity cDNA reverse transcription kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) segítségével 20 µl végtérfogatban.

A real-time PCR-t Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) segítségével kiviteleztük ABI StepOne készüléken, a gyártó utasításait követve. A reakciók során használt primereket Primer Express 3.0 program segítségével terveztük meg, amelyek a következők voltak:

GAPDH:

(f) TGACGTGCCGCCTGGAGAAA

(r) AGTGTAGCCCAAGATGCCCTTCAG

TNF- α :

(f) CAGCCGATGGGTTGTACCTT

(r) GGCAGCCTTGTCCCTTGA

IL-10:

(f) AGTGAGAAGCTGAAGACCCTCAGG

(r) TTCATGGCCTTGTAGACACCTTGGT

IL-1 β :

(f) TTGACGGACCCCAAAGATG

(r) TGGACAGCCCAGGTCAAAG

NLRP3:

f) CAGAGCCTACAGTTGGGTGAA

(r) ACGCCTACCAGGAAATCTCG

A GAPDH-nál mért értékeket használtuk belső kontrollként. A PCR termékek azonosítását célzó „melting curve analízist”, valamint a kapott génexpressziós eredmények kiértékelését ABI StepOne készülék saját szoftverének (v.2.0) segítségével végeztük el.

16. Statisztika

Az eredmények szignifikáns voltát – ahol ez lehetséges volt – Student-féle t -próba segítségével határoztuk meg, $p < 0,5$ figyelembe vételével. Az eredményeket átlag és szórás formájában ábrázoltuk.

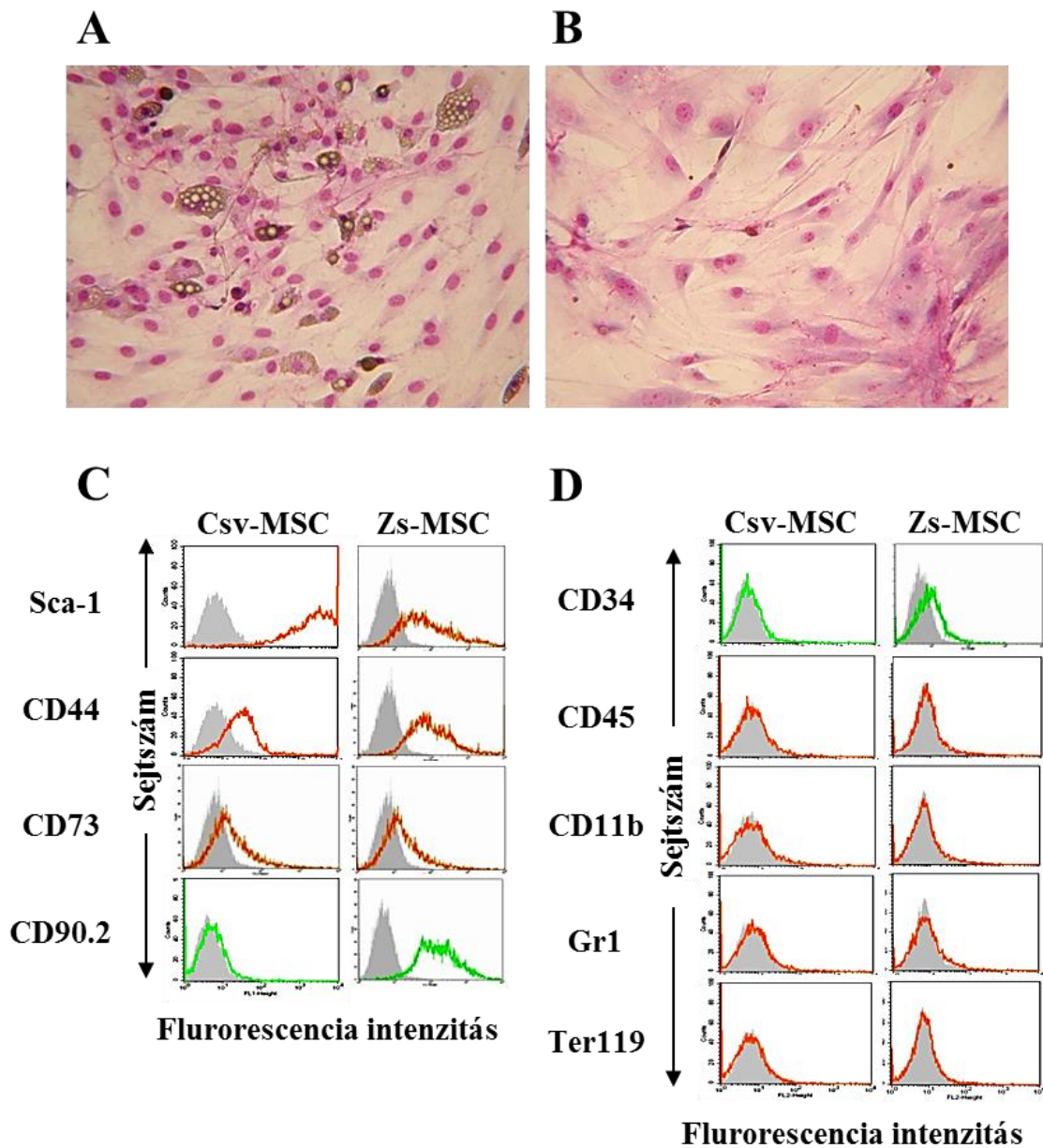
Eredmények

1. A mesenchymalis őssejt populációk jellemzése: felszíni markerek és differenciálódási képesség

Felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből valamint hasi és ágyéki zsírszövetéből stroma tenyészeteket készítettünk a Módszerek részben leírtak szerint. Kísérleteinket legalább nyolcszor átoltott sejtekkel végeztük, mivel korábbi mérési eredményeink és irodalmi adatok [77] szerint is a csontvelői stroma tenyészetek a 7-8. átoltásig vérképzőszervi eredetű elemeket – főként makrofágokat - is tartalmaznak. Fontos megjegyezni azt is, hogy a tenyésztés során az egér MSC-k kivétel nélkül spontán immortalizálódnak, ezért korlátlan ideig fenntarthatók *in vitro* kultúrában. Kísérleti munkánkhoz azonban sosem használtunk 18. passzálnál idősebb sejteket, mert tapasztalataink szerint 20-25 átoltás felett megnő a fenotípusos és plaszticitásbeli változások előfordulásának veszélye (nem mutatjuk).

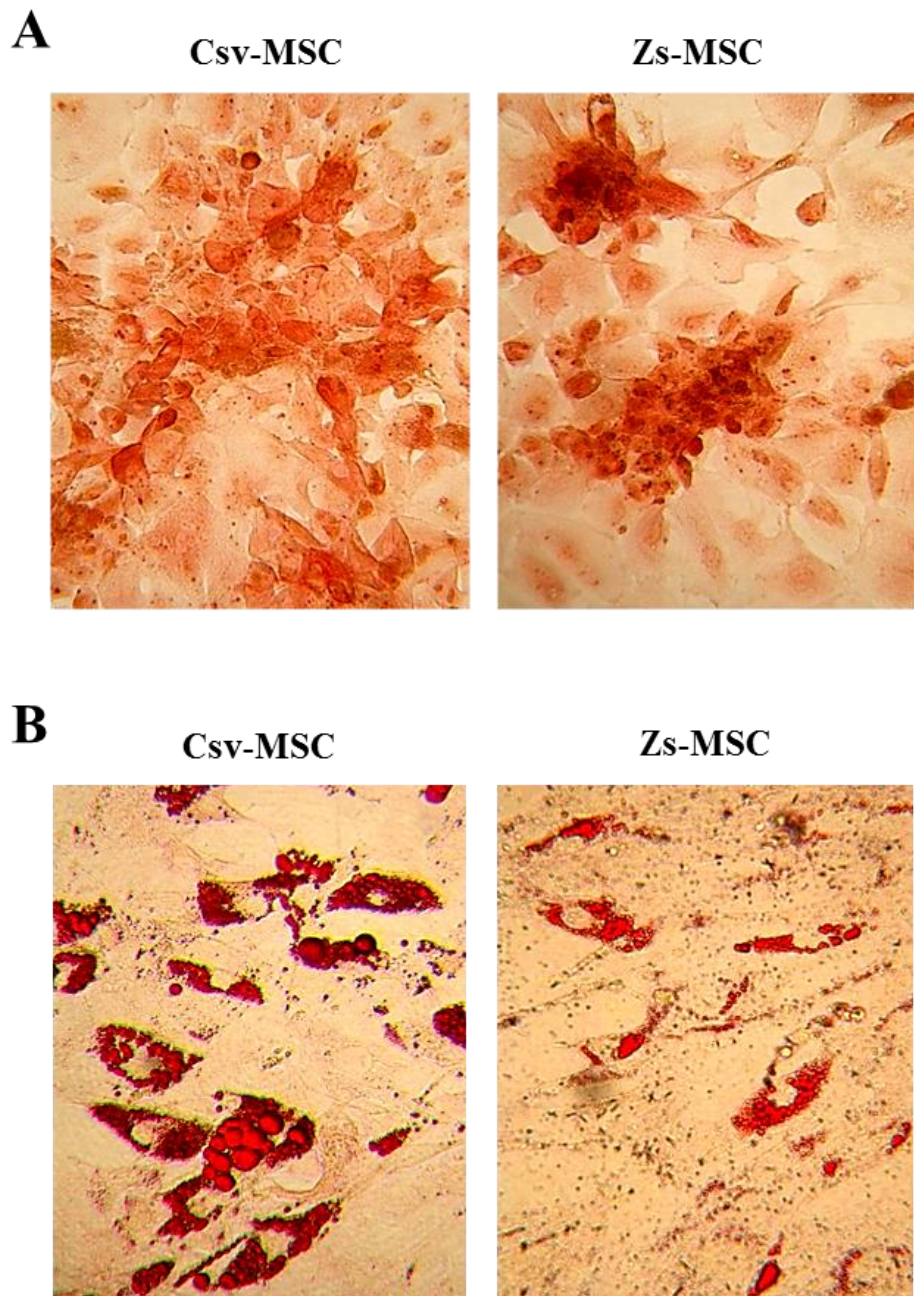
A 8. átoltás után a csontvelői (Csv-MSc) és a zsírszövet eredetű (Zs-MSc) mesenchymalis őssejt tenyészetek egyaránt adherens, fibroblast-szerű morfológiát mutató sejtekből álltak (3/A. és 3/B. ábra). Áramlási citometriás vizsgálataink eredménye szerint ezek a sejtpopulációk Sca-1 és CD44 markerekre pozitívak voltak, míg CD73-at csak kis mennyiségben fejeztek ki felszínükön. CD90.2 antigén kizárólag a zsírszövet eredetű stroma sejtek expresszáltak (3/C. ábra). Ugyanakkor tenyészeink egyöntetűen negatívnak bizonyultak a vizsgált (CD34, CD45, CD11b, Gr-1, Ter-119) haematopoetikus markerekre (3/D. ábra) és lágy gélben nem képeztek kolóniákat (nem mutatjuk). Mindkét MSc populációban a sejtek megfelelő induktorok hatására osteoblast, illetve adipocytá irányba differenciálódtak (4. ábra), így tehát multipotensnek (illetve legalábbis bipotensnek) tekinthetőek.

A felnőtt egerek csontvelőjéből és zsírszövetéből izolált sejtenyészeteink tehát morfológiájukat, sejtfelszíni markereiket és differenciációs képességüket tekintve kielégítik a bevezetésben megfogalmazott követelményeket, vagyis mesenchymalis őssejteknek tekinthetőek. Hasonlóképpen minden kritériumnak megfelelő MSc populációkat nyerhetünk fiatal (14napos) C57Bl/6 egerek csontvelőjéből, aortafalából, lépéből és thymusából is (lásd [78]).



3. ábra A csontvelő és zsírszövet eredetű egér mesenchymalis őssejtek jellemzése

Csontvelői (A) és zsírszövet eredetű (B) adherens stroma sejtek morfológiai képe (Giemsa-festés, eredeti nagyítás tízszerese) Az MSC-kre jellemző sejtfelszíni markerek (C), illetve a vérképző ő- és elődsejtek, valamint véresejt-fejlődési sorok jellegzetes antigénjeinek (D) hisztogramjai, ahol a szürke háttérű görbék az izotípus kontrollal, a színes vonalak pedig a fikoeritrinnel (piros) vagy fluoreszcein-izotiocianáttal (zöld) konjugált ellenanyaggal jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitását jelzik.



4. ábra A csontvelő és zsírszövet eredetű eger mesenchymalis őssejtek osteoblast (A) és adipocyta (B) irányú differenciációja

Az (A) ábrán olajvörös festék segítségével tettük láthatóvá a sejtek közötti térben a 14 napos differenciációs időszak alatt felhalmozódott kalciumot, míg a (B) ábrán alizarin vörös festéssel jelöltük meg a sejtekben felgyülemlett lipidcseppeket (a képek eredeti nagyítása 20x-os).

2. Az MSC-k immunszuppresszív és gyulladásgátló képességének vizsgálta

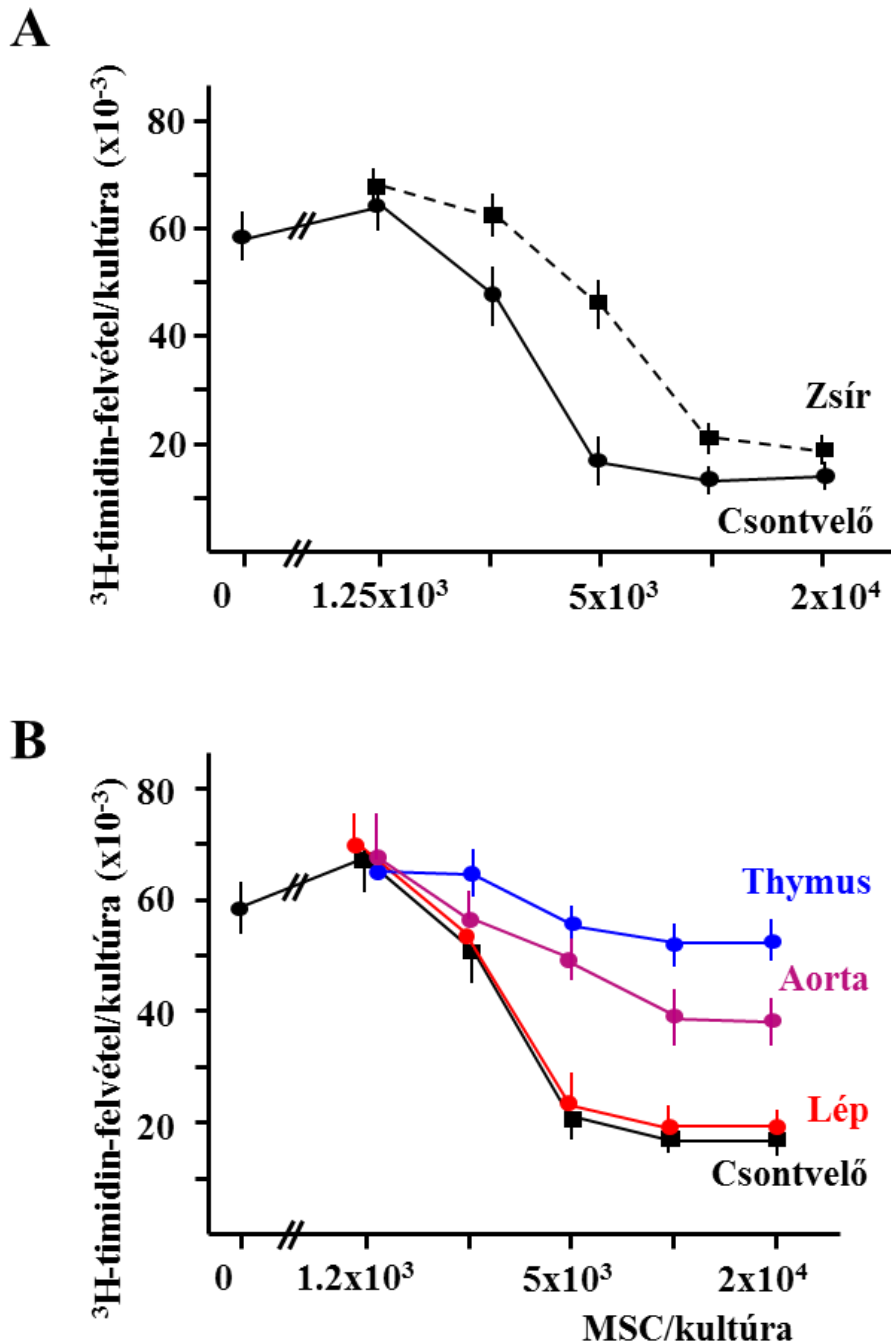
A mesenchymalis őssejtek talán legigéretesebb és terápiás szempontból leginkább kiaknázható sajátága az *in vitro* kultúrákban és *in vivo* kísérleti rendszerekben is megfigyelhető erőteljes immunszuppresszív és gyulladásgátló képességük [79].

2.1. A mitogén és alloantigén-indukált T-sejt proliferáció gátlása *in vitro* kultúrában

Elsőként azt szeretnénk volna bizonyítani, hogy az általunk különböző szervekből izolált MSC-k valóban képesek az aktivált T-sejtek osztódását gátolni. Mint azt az 5/A. ábra mutatja, a felnőtt állatok csontvelőjéből és zsírszövetéből származó MSC populációk eltérő mértékben ugyan, de képesek gátolni a ConA indukált T sejt proliferációt. A különbség leginkább 5×10^3 MSC jelenlétében mutatkozik meg, ami 1:40-hez MSC:T-sejt arányt jelent. Ekkor ugyanis a Csv-MSK-k már maximálisan (kb. 70%-ban) képesek gátolni a mitogén stimulált T sejtek osztódását, ezzel szemben a Zs-MSK-k alig fejtenek ki gátló aktivitást. A zsírszövet eredetű őssejtek csak magasabb, 1:20 MSC:T-sejt aránynál érik el gátló aktivitásuk maximumát (kb. 65%), ami intenzitását tekintve nem tér el szignifikáns mértékben csontvelői társaik immunszuppresszív képességétől. Ezt az eredményt figyelembe véve a további kísérleteket 1:20, valamint 1:10 MSC:T-sejt aránynál végeztük el. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a lép T-sejtek alloantigénre adott válaszána gátlását vizsgáltuk kevert limfocita kultúrákban (MLR) (nem mutatjuk).

Ezután megvizsgáltuk, hogy a fiatal (14 napos) állatok különböző testtájairól származó stroma sejt populációk immunszuppresszív aktivitásában van-e különbség. Ahogy az az 5/B. ábrán is látható, a csontvelő és lép eredetű MSC-k erősen (kb. 70%-ban) képesek gátolni a T limfociták proliferációját, az aorta fal eredetű MSC-k gátló aktivitása ennél mérsékeltebb (kb. 40%-os), míg a thymus eredetű sejtek nem képesek a mitogén (ConA) indukált T-sejt osztódást befolyásolni. Tendenciájában ezzel megegyező eredményt kaptunk kevert limfocita kultúrákban (nem mutatjuk).

Tehát a különböző forrásból származó MSC populáció immunszuppresszív aktivitása jelentősen eltérhet egymástól *in vitro* kultúrában.



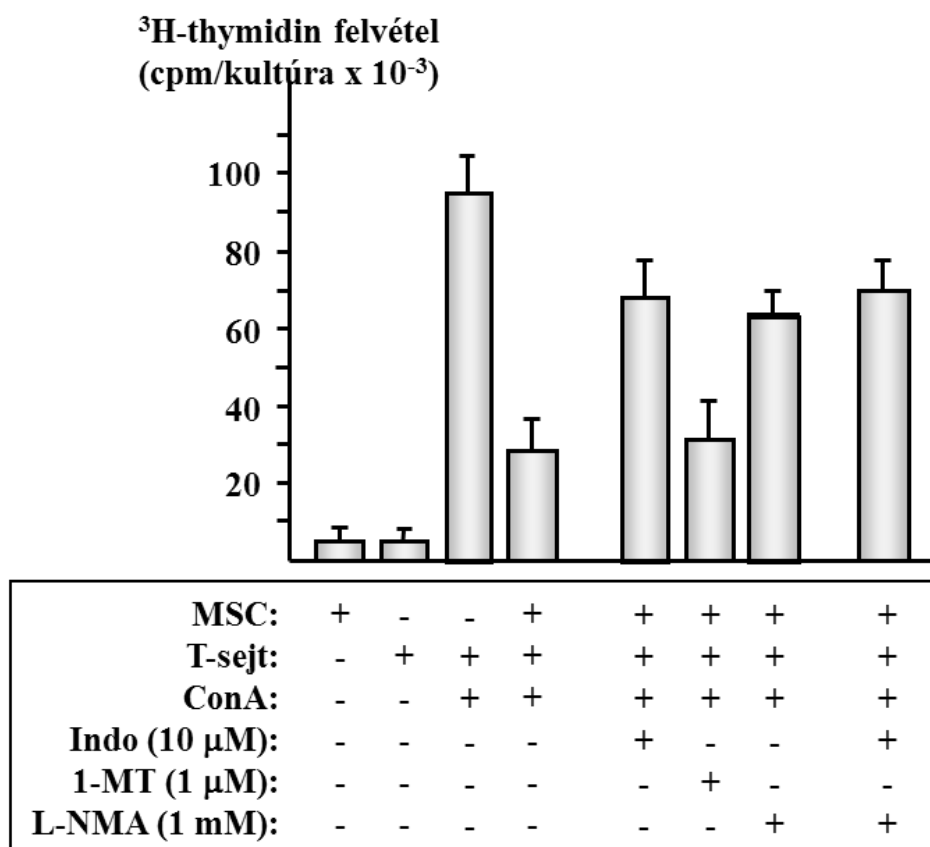
5. ábra. A különböző szervekből izolált mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitása. (A) 5 µg/ml ConA-val stimulált lépsejtek (2×10^5 sejt/kultúra) ^3H -timidin-felvétele különböző számú felnőtt állatból származó csontvelői (folytonos vonal) vagy zsírszövet eredetű (szaggatott vonal) MSC jelenlétében. (B) A 14 napos egerekből izolált csontvelői, aorta, lép és thymus eredetű MSCk ConA-stimulált lépsejt proliferáció gátlása. Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábráztuk ($n=3$).

2.2. Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása különböző enzim gátlók jelenlétében

Az irodalmi adatok [80] alapján felvetődő, az MSC-kből felszabaduló különböző szolubilis mediátorok szintéziséért felelős enzimek aktivitásának gátlásával próbáltuk feltárni az immunszuppresszió mechanizmusát. Mitogénnel stimulált lép T-sejtekből és csontvelői vagy zsírszövet eredetű MSC-kből álló tenyészetekhez enzimgátlókat adtunk magas, de sejtpusztulást még nem okozó koncentrációban.

Ahogy azt korábban is láthattuk, ez esetben is kimutatható, hogy ConA stimuláció hatására a T-sejtek proliferációja kb. tízszeresére nő meg (6. ábra). Ezt a fokozott sejtosztódást a csontvelői MSC-k egyidejű jelenléte harmadára képes csökkenteni. Ha indometacint (Indo), vagyis a PGE2 szintéziséért felelős ciklooxygenáz (COX-1, COX-2) enzimek gátlószerét vagy a nitrogén-oxid-szintáz (NOS-t) gátló N-metil-L-arginin-acetátot (L-NMA-t) adunk a sejtekhez, akkor a T sejt proliferáció részben, de nem teljesen helyreáll. Ha ezt a két inhibitorát együttesen alkalmazzuk, akkor nem tapasztalunk további proliferáció emelkedést, tehát hatásuk nem additív. Ha viszont metil-triptofánt (1-MT-t) adunk a sejtekhez és ezzel az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzim aktivitását gátoljuk, akkor nem csökken az MSC-k proliferáció gátló képessége, vagyis az IDO – legalábbis egér MSC-k esetében – nem játszik szerepet az immunszuppresszív aktivitásban. Így hát a továbbiakban mellőztük ennek az enzimnek a vizsgálatát és inhibitorának alkalmazását is.

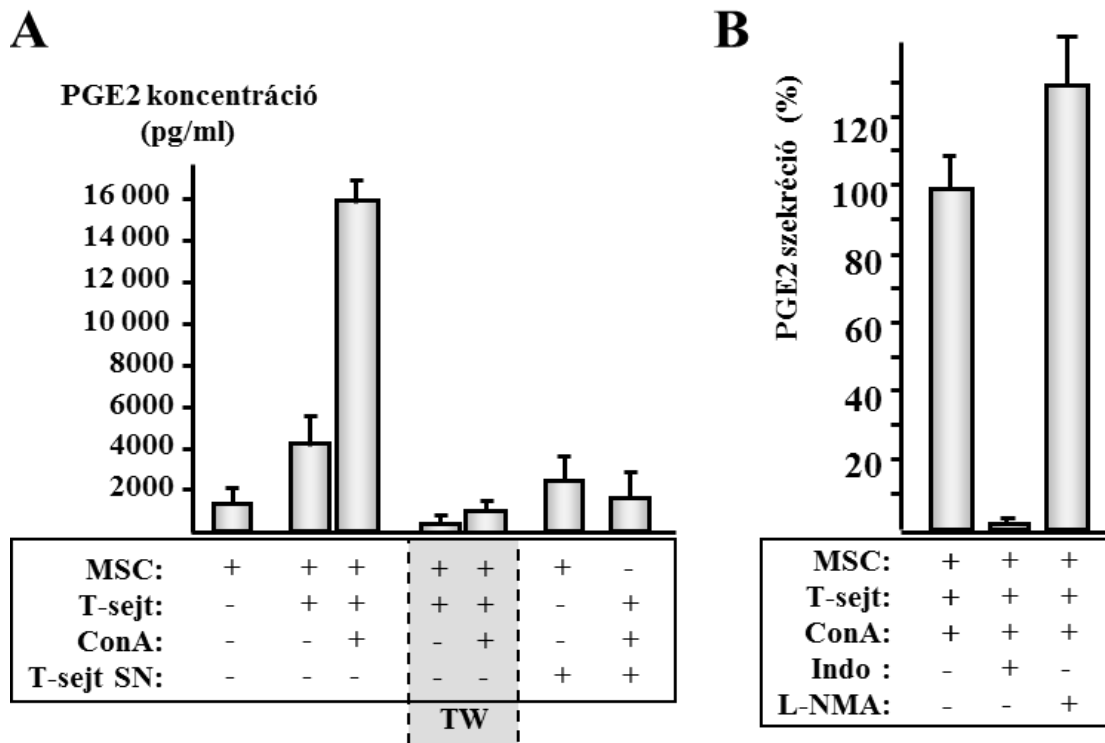
Kevert limfocita kultúra valamint zsírszövet eredetű MSC-k esetében is a fentiekkel megegyező eredményt kaptunk (nem mutatjuk). Így kijelenthetjük, hogy az MSC-k T-sejt proliferáció gátló aktivitásában a prosztaglandin(ok)nak és a NO-nak is szerepe van, de nem csak és kizárólag e két molekula felelős a hatás közvetítéséért, hiszen szintézisük együttes gátlásakor sem áll helyre teljesen a T limfociták osztódása. Ugyanakkor, ha a T-sejteket és az MSC-ket félig áteresztő hártyával választjuk el egymástól („trans-well” elrendezésű kultúrákban), akkor az őssejtek már nem képesek gátolni a T limfociták osztódását (nem mutatjuk). Ebből arra következtethetünk, hogy az MSC-k és az aktivált T sejtek között közvetlen kölcsönhatás is szükséges ahhoz, hogy az imént megfigyelt gátló aktivitás érvényre juthasson.



6. ábra. Az MSCk immunszuppresszív aktivitása különböző enzim gátlók jelenlétében. 5 µg/ml ConA-val stimulált T lymphocyták (2×10^6 sejt/kultúra) ³H-timidin-felvétele 2×10^5 Csv- MSC egyidejű jelenlétében, különböző enzim gátló szerek hozzáadásával vagy anélkül. (Indo = Indometacin, ciklooxygenáz enzim gátló; L-NMA = N-metil-L-arginin-acetát, nitrogén-oxid-szintáz (NOS) gátló ; 1-MT = metil-triptofán, indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO) gátló.) Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltuk (n=3).

2.3. Az MSC-k prosztaglandin E2 (PGE2) termelése aktivált T sejtek jelenlétében

A fenti eredmények és korábbi irodalmi adatok [44, 81] együttes figyelembe vételével a továbbiakban a Csv- és Zs- MSC-k prosztaglandin E2 termelésének vizsgálatára koncentráltunk. Arra voltunk kíváncsiak, hogy az MSC-k PGE2 termelése hogyan változik aktivált T sejtek jelenlétében. A csontvelői őssejtek kontrollként tekintett alap PGE2 termelése 1200 pg/ml körül adódik, ez az érték naív T sejtek jelenlétében 4000 pg/ml-re nő meg (7/A. ábra). Ha ConA-val stimuláljuk a limfocitákat, akkor a prosztaglandin E2 termelés tovább nő, így ez esetben a kontrollhoz képest



7. ábra. AZ MSCk PGE2 termelése aktivált T sejtek jelenlétében

5 µg/ml ConA-val stimulált T sejteket (2×10^6 /well) 24 lyukú, lapos fenekű plateken tenyésztettünk 2×10^5 csontvelői eredetű MSC jelenlétében, majd 48 óra elteltével a felülúszókból vett mintákból prosztaglandin E2-t mértünk gyári kvantitatív ELISA kitek segítségével. (A) A „T-sejt SN” felirat ConA aktivált T sejtek négyszer hígított felülúszóját jelenti, míg TW rövidítéssel azokat a kísérleteket jelöltük meg, amelyek során a kétféle sejtípust 1 µm pórusátmérőjű féligáteresztő hártával választottuk el egymástól. (B) A sejt kultúrákhoz 10 µM indometacint (Indo) vagy 1 mM N-metil-L-arginin-acetátot (L-NMA) adtunk a tenyésztés megkezdésekor. Az eredményeket átlag ± szórás formában ábrázoltuk (n=3).

négyszer több, 16000 pg/ml PGE2-t mérhetünk a felülúszóban. Ha viszont a T-sejteket és az Csv-MSK-et térben elválasztottuk egymástól („trans-well” kultúrákban), vagy intakt T limfociták helyett csak a mitogén-stimulált T-sejtek korábban gyűjtött felülúszóját (kondicionált médiumát) adtuk az MSC kultúrákhoz, az őssejtek PGE2 szekréciója soha nem emelkedett a kontrollnak tekintett érték (1200 pg/ml) fölé. Ez arra enged következtetni, hogy az aktivált T limfociták fokozni képesek a mesenchymalis

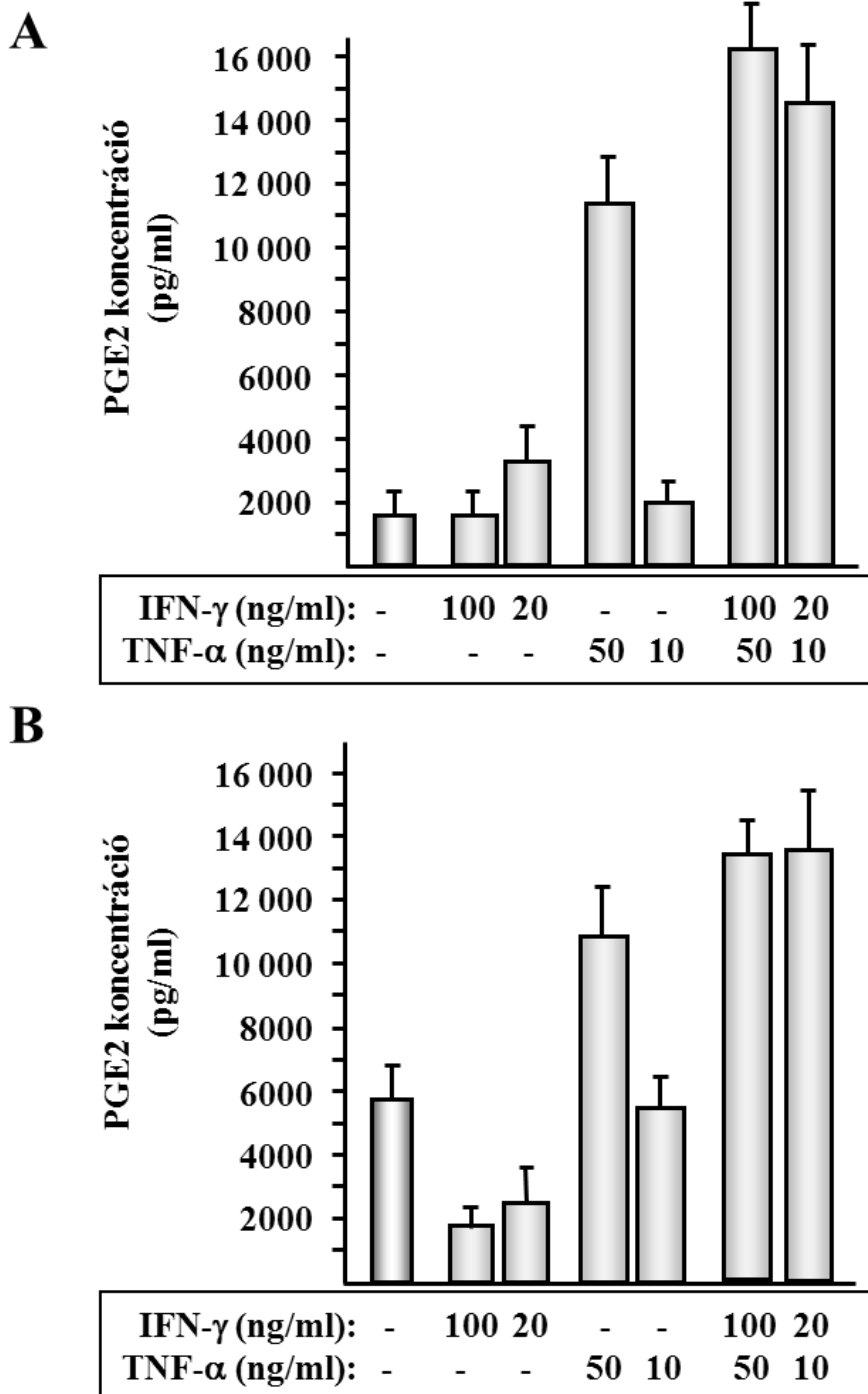
őssejtek prosztaglandin E2 szintézisét, de ennek bekövetkeztéhez mindenképpen sejt-sejt kölcsönhatás szükséges.

Ahogy az várható volt, az aktivált T-sejtek PGE2 termelés indukáló hatása indometacint (Indo) jelenlétében szinte teljes egészében megszűnt, az L-NMA azonban – ebben a kísérleti rendszerben - nem befolyásolta a mediátor termelését (7/B. ábra). Ez azt jelenti, hogy aktivált T sejtek jelenlétében az MSC-k PGE2 termelése a NO jelenlététől független.

Az 7. ábrán bemutatott kísérleteket elvégeztük zsírszövet eredetű mesenchymalis őssejtekkel is, melynek során a Csv-MSK-k esetén leírtakhoz hasonló eredményt kaptunk (nem mutatjuk). Egyetlen különbségként azt emelném ki, hogy a Zs-MSK-k spontán PGE2 termelése valamivel magasabb, kb 3800 pg/ml volt (nem mutatjuk).

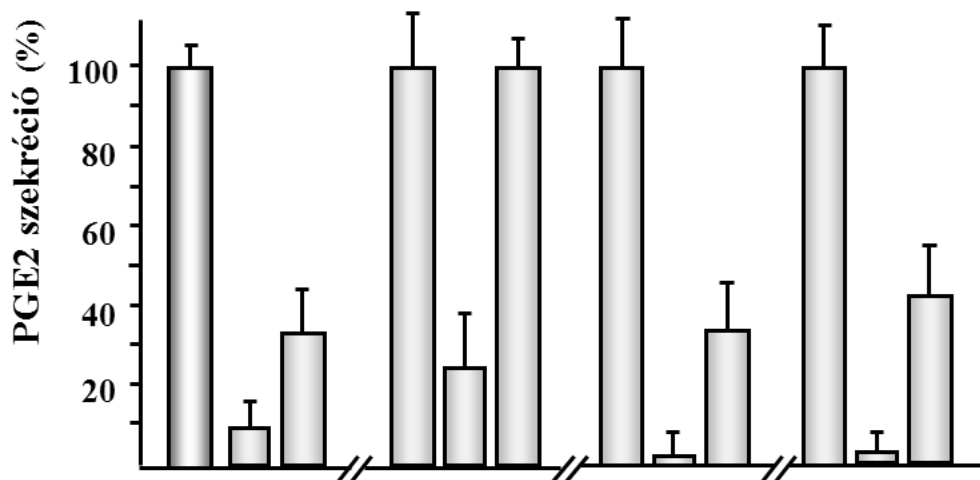
2.4. A gyulladós környezet hatása a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2 termelésének szabályozására

A gyulladós környezet modellezésére Csv- és Zs-MSK tenyészetekhez rekombináns citokineket adtunk *in vitro* (8/A. és 8/B. ábra). A TNF- α magasabb, 50 ng/ml koncentrációban jelentősen fokozta az MSC-k PGE2 termelését – ekkor 11000 pg/ml feletti értékeket mértünk –, míg alacsonyabb (10 ng/ml) koncentrációban már hatástalannak bizonyult. Ha az MSC-khez IFN- γ -t adtunk, egyik vizsgált koncentrációban (100 és 20 ng/ml) sem tapasztaltunk szignifikáns változást. Ugyanakkor, ha a két citokint együttesen alkalmaztuk, már alacsony koncentrációik (10 ng/ml TNF- α és 20 ng/ml IFN- γ) esetén is jelentősen megnő a szekretált PGE2 mennyisége. Így elmondhatjuk, hogy a IFN- γ jelentősen fokozni képes a mesenchymalis őssejtek TNF- α indukálta PGE2 termelését, tehát a gyulladós citokinek hatása erősen szinergisztikus. 10 μ M indometacin hozzáadása csontvelői MSC kultúrák esetén nem csak a spontán, de a gyulladós mediátorok által stimulált PGE2 szekréciót is szinte teljes egészében gátolni képes (9. ábra). A TNF- α és az IFN- γ egyidejű jelenlétében indukált PGE2 termelés L-NMA-val is gátolható (noha csak 60-70%-osan). Ezzel szemben az 50 ng/ml koncentrációjú TNF- α -val stimulált PGE2 szekrécióra a NOS enzim gátlása nincs szignifikáns hatással.



8. ábra. AZ MSCk TNF- α indukálta PGE2 szekrécióját az IFN- γ fokozni képes.

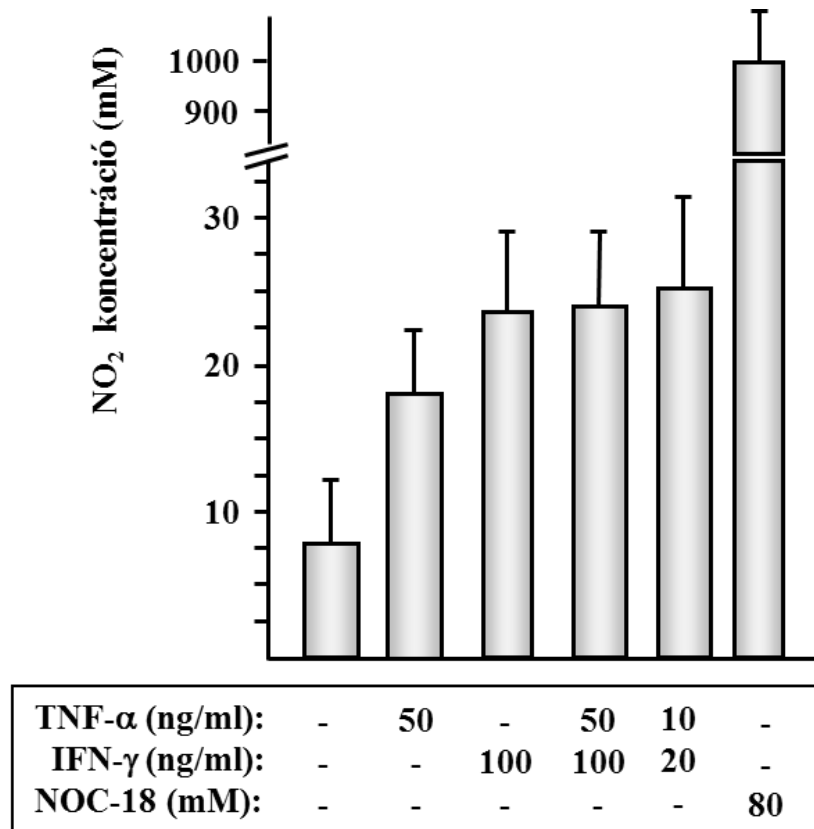
2×10^5 csontvelői (A) és zsírszövet (B) eredetű MSC-t inkubáltunk 48 órán keresztül az ábrán jelzett koncentrációjú IFN- γ és/vagy TNF- α jelenlétében vagy anélkül. A tenyésztési idő elteltével a felülúszókból mintákat vettünk és gyári kvantitatív ELISA kitek segítségével megmértük a prosztaglandnin E2 koncentrációt. Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltuk (n=3).



TNF-α (ng/ml):	-	-	-	50	50	50	50	50	50	10	10	10
IFN-γ (ng/ml):	-	-	-	-	-	-	100	100	100	20	20	20
Indo (10 mM):	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-
L-NMA (1 mM):	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	+

9. ábra. A gyulladásos citokinek által stimulált PGE2 termelés gátlása indometacinnal és L-NMA-val 2×10^5 csontvelői eredetű MSC-t inkubáltunk 48 órán keresztül az ábrán jelzett koncentrációjú IFN γ -val, TNF α -val, indometacinnal és/vagy L-NMA-val a feltüntetett kombinációkban. A tenyésztési idő elteltével a felülúszókból nyert mintákban ELISA kitek segítségével mértük meg a prosztaglandin E2 koncentrációt. Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltuk (n=3).

Ezt követően megvizsgáltuk, hogy az MSC-k nitrogén-monoxid (NO) (pontosabban a kísérleti körülmények között mérhető nitrit) termelését hogyan befolyásolja a gyulladásos citokinek jelenléte. Azt tapasztaltuk, hogy 2×10^5 Csv-MSK $8,1 \pm 4,2 \mu\text{M}$ nitritet szekretált (10. ábra). A vizsgált citokinek külön-külön és együttesen alkalmazva – koncentrációjuktól függetlenül – kb. 2-3-szorosán fokozták az őssejtek NO termelését a kezeletlen kontrollhoz képest. Hasonló eredményre jutottunk zsírszövet eredetű MSC-k vizsgálatokor is (nem mutatjuk). Ugyanebben a kísérleti rendszerben egy NO donor molekula, a NOC-18 ennél sokkal számottevőbben (120-szorosán) fokozta a nitrit termelést. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy a NO-nak a PGE2 termelés szabályozása során elsősorban az MSC-ken belüli jeltovábbításban lehet szerepe.

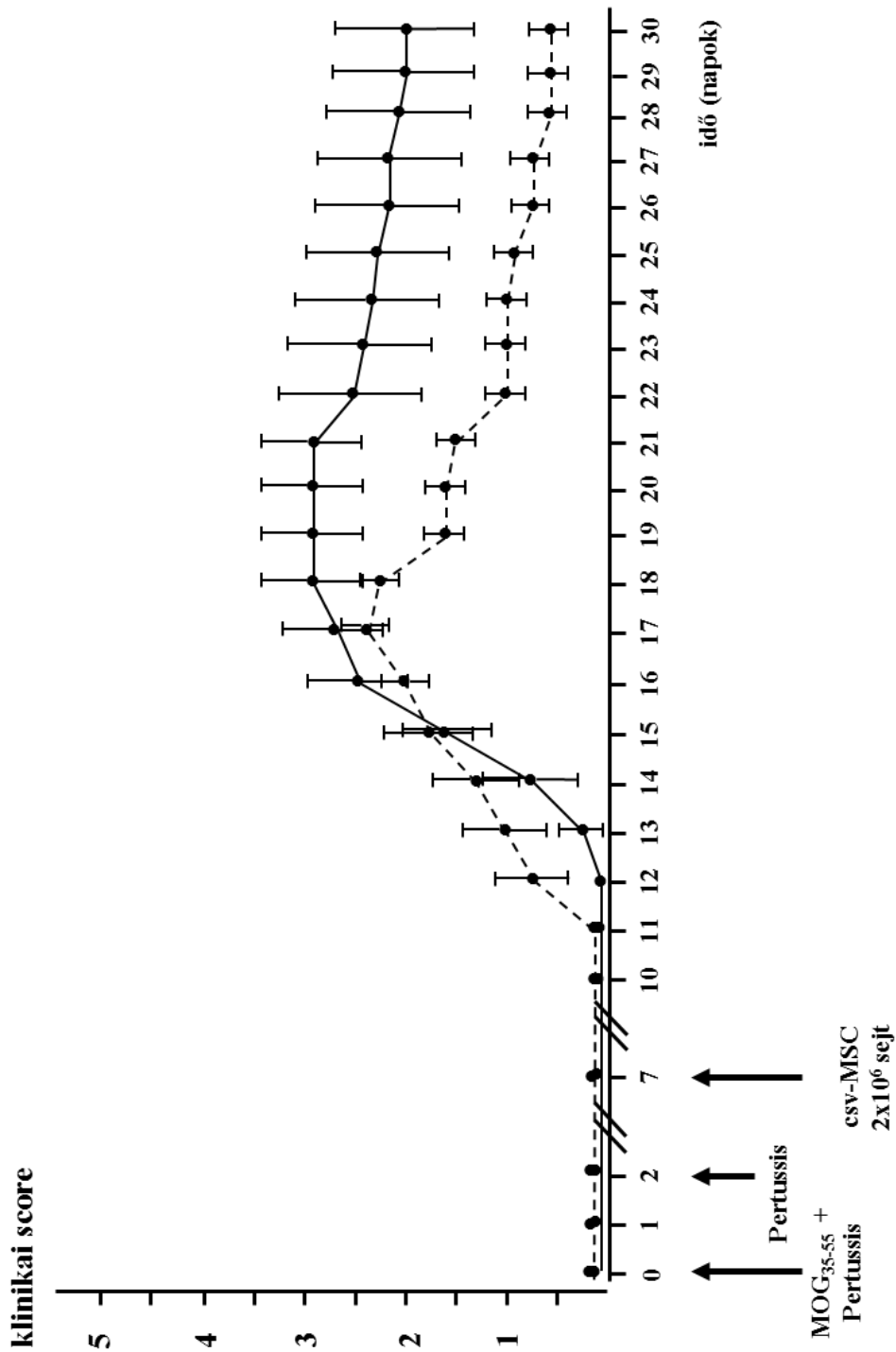


10. ábra. A mesenchymalis őssejtek NO₂ termelése gyulladásoos citokinek jelenlétében. 2×10^5 csontvelői eredetű MSC-t inkubáltunk 48 órán keresztül a feltüntetett koncentrációjú IFN- γ , TNF- α , vagy NOC-18 jelenlétében vagy anélkül, a feltüntetett kombinációkban. A tenyésztési idő elteltével gyári, kvantitatív ELISA kitek segítségével mértük meg felülúszókban a NO₂ koncentrációt. Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltuk (n=3).

2.5 Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása *in vivo* betegség modellben – a kísérletes autoimmun encephalomyelitis őssejtterápiája

Mivel az eddig bemutatott *in vitro* vizsgálati eredményeink és irodalmi adatok [74, 82, 83] is arra engednek következtetni, hogy az MSC-k immunszuppresszív aktivitása terápiás célra is felhasználható, ezért az emberi sclerosis multiplex egy preklinikai állatmodelljében, a kísérletes autoimmun encephalomyelitisben (EAE-ben) vizsgáltuk sejtjeink hatását.

A betegséget MOG₃₅₋₅₅ peptid és komplett Freund adjuváns keverékével, valamint Pertussis toxin segítségével indukáltuk fiatal felnőtt (12 hetes) C57Bl/6 nőtény egerekben, amelyek 10-14 nap elteltével postero-anterior irányban fokozatosan lebénultak. A betegség súlyosságát egy 5 fokozatú skálán pontoztuk, a Módszerek fejezetben leírtak szerint, majd a pontok átlagából a betegség súlyosságát az idő függvényében ábrázoló diagramot készítettünk (11. ábra). A kontroll csoporthoz képest a 7. napon 2×10^6 csontvelői eredetű mesenchymalis őssejt intraperitoneális beadásával kezelt egerek a betegség első fázisában, átmenetileg súlyosabb tüneteket mutatnak, ami azonban a statisztikai kiértékelés szerint nem tekinthető szignifikánsnak. (A kezelés optimális időpontját számos előkísérlet alapján határoztuk meg, amelyek eredményeit nem mutatjuk.) A betegség legsúlyosabb szakaszában (15-18. napon) egyáltalán nincs különbség az őssejtekkel kezelt, illetve a nem kezelt állatok bénulásának mértékében. Ezt követően (a 19. naptól) viszont a sejtterápián átesett egerekben szignifikánsan gyorsabb állapot-javulás következik be, mint kontroll társaikban. Az MSC kezelés tehát elsősorban nem az EAE indukcióját és progresszióját gátolja, hanem modellünkben sokkal inkább a betegség remisszióját segíti elő. Mivel az agy- és gerincvelőben zajló gyulladási folyamat(ok) fő effektor sejtjei EAE esetében (is) a mikroglia sejtek [84], továbbiakban a mesenchymalis őssejtek mikroglia sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatára összpontosítottunk *in vitro* kísérleti körülmények között.

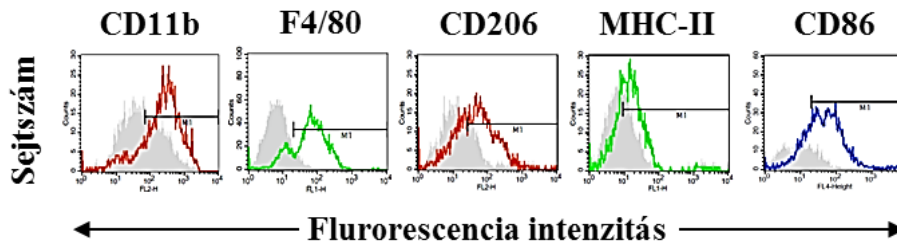


11. ábra. A kísérleti autoimmun encephalomyelitises (EAE-s) egerek tüneteinek súlyosságát az MSC kezelés jelentősen csökkenteni képes. Az EAE-s egerek betegségének súlyosságát reprezentáló klinikai pontérték (score) átlaga az idő függvényben, ahol a folytonos vonal a kontroll csoport, míg a szaggatott vonal a 7. napon 2×10^6 csontvelői MSC intraperitoneális beadásával kezelt csoport értékeit mutatja ($n=6$). Az eredményeket átlag \pm SEM formában ábrázoltuk

3. Az MSC-k mikroglia sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata

3.1 A mikroglia sejtek karakterizálása és morfológiájuk változása MSC-k jelenlétében

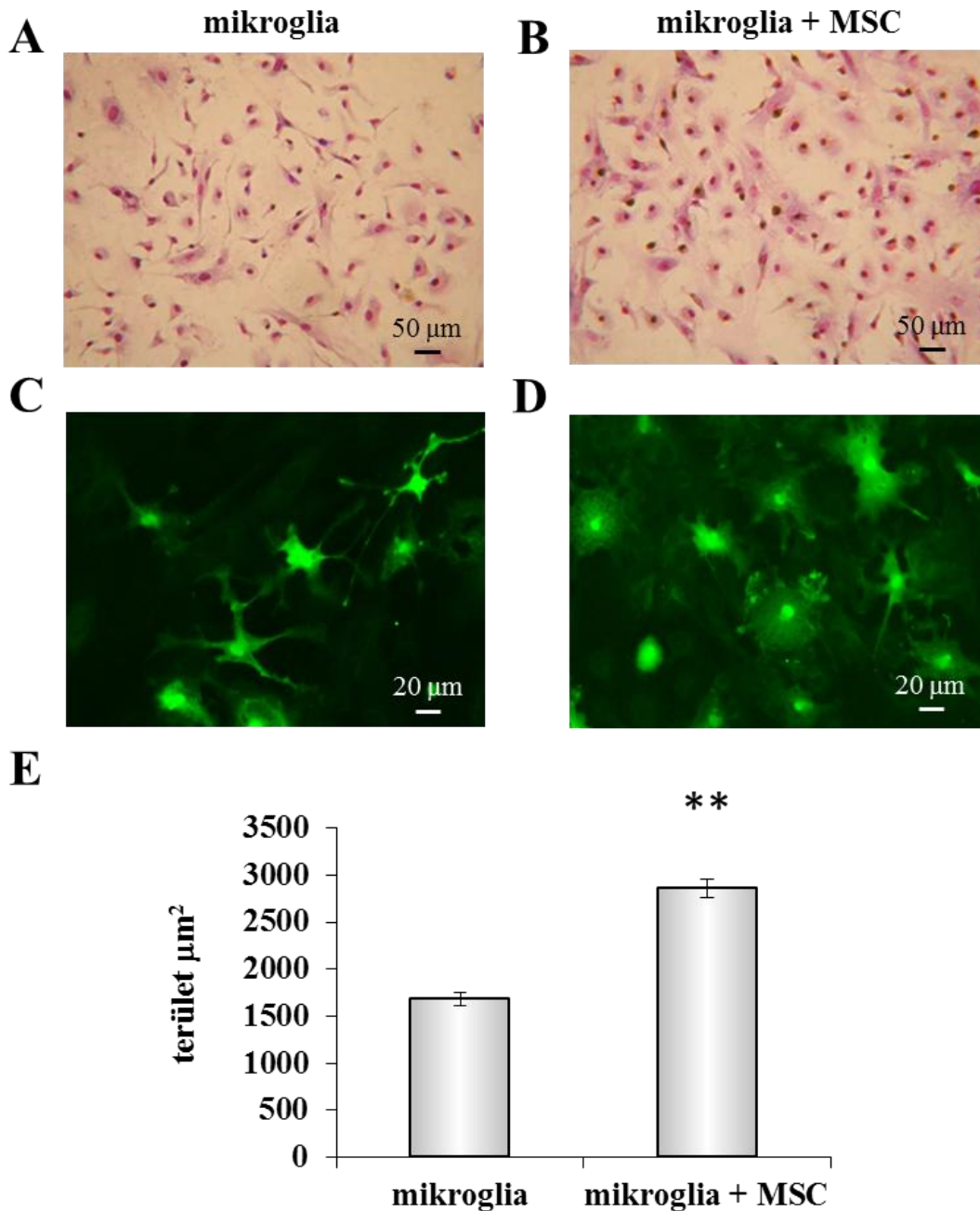
Újszülött (P1-P3) CD1 egerek agyvelejéből, főként astrocyta és mikroglia sejtekből álló kevert glia tenyészeteket készítettünk, majd ezekből két lépcsős tripszinezési eljárással (lásd Módszerek fejezet) szelektíven izoláltunk mikroglia sejteket. Áramlási citometriás vizsgálataink eredménye szerint ez a sejtpopuláció $85\pm 6\%$ -ban tartalmazott CD11b és $70\pm 5\%$ -ban F4/80 markerekre pozitív sejteket, és enyhén pozitívak voltak CD206, MHC-II és CD86 sejtfelszíni antigénekre (12. ábra).



12 ábra. A mikroglia sejtek felszíni markereinek hisztogramjai, ahol a szürke háttérű görbék az izotípus kontrollal, a színes vonalak pedig a fikoeritrinnel (piros), allofikocianinnal (kék) vagy fluoreszcein-izotiocianáttal (zöld) konjugált ellenanyaggal jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitását jelzik. A három párhuzamos mérés közül egy reprezentatívnak tekinthető kísérlet eredményét mutatjuk.

Általános morfológiájukat tekintve többszörösen elágazó, nyugalmi sejtalakokkal jellemezte azokat (13/A. ábra), amely mesenchymalis őssejtek egyidejű jelenlétében jelentősen megváltozott (13/B. ábra), hiszen ekkor a mikroglia sejtek egy kiterült, aktiválódott, amőboid fenotípust vettek fel még akkor is, ha a két sejtípust félig áteresztő hártával térben elválasztottuk egymástól.

Annak érdekében, hogy ezt a morfológiai változást még alaposabban tanulmányozhassuk, fraktalkin receptorhoz kötötten GFP-t (zöld fluoreszkáló fehérjét) expresszáló mikroglia sejteket izoláltunk CX3CR1^{+/GFP} transzgenikus C57Bl/6 egerekből. Ennek az egértörzsnek az egyedeiben a központi idegrendszer parenhima állományán belül csak a mikroglia sejtek mutatnak zöld fluoreszcenciát, így azok



13. ábra. A mikroglia sejtek morfológiájában és kiterültségében bekövetkező változások mesenchymalis őssejtek jelenlétében. 10^5 CD11b⁺ egér eredetű mikroglia sejtet inkubáltunk 48 órán keresztül önmagában (A) vagy 10^4 csv-MSC jelenlétében (B), majd paraformaldehides fixálást követően Giemsa oldattal festettük meg azokat. CX3CR1⁺/GFP egér eredetű mikroglia sejtek fluorescens mikroszkópos képe, amelyeket 48 órán tenyésztettünk magukban (C) vagy 10^4 csv-MSC jelenlétében (D). (E) Területmérés eredményei, ahol ** $p < 0,01$ a mikroglia kontrollhoz képest. (n=45)

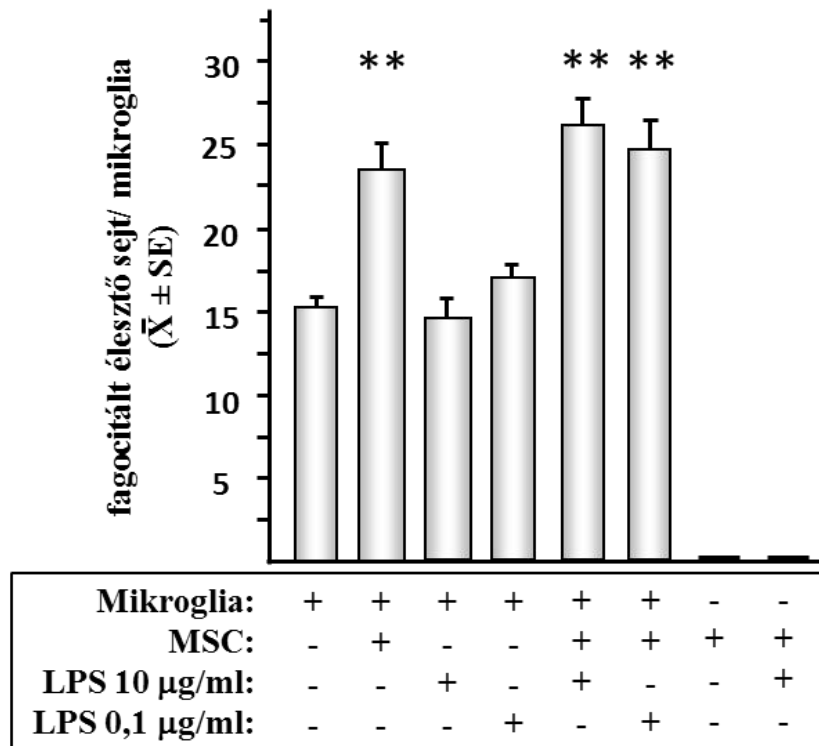
szelektíven vizsgálhatók. A CX3CR1^{+/GFP} mikroglia sejtek esetén is megfigyelhetjük (13/C. ábrán látható nyugalmi állapothoz képest) az MSC-k jelenlétében tapasztalható morfológiai változást (13/D. ábra). Ennek a szemmel is jól látható változásnak a számszerűsítéseként fényképfelvételeken mintánként legalább 45 független sejt területét mértük meg képanalízis szoftver segítségével, majd átlagoltuk azokat. Mint ahogy az a 13/E. ábrán látható MSC-k jelenlétében szignifikánsan nagyobb a mikroglia sejtek átlagos terület.

3.2 A mikroglia sejtek élesztő és apoptotizáló thymocytá fagocitózisának vizsgálata

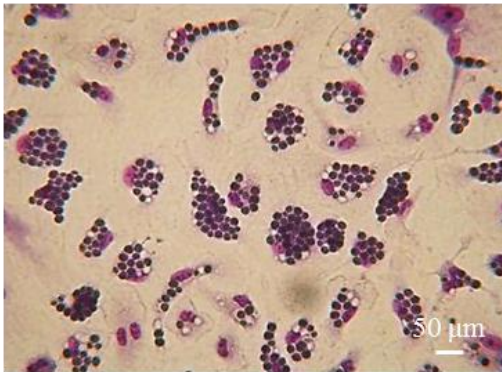
Ezután funkcionális tesztekben vizsgáltuk az MSC-k mikroglia sejtre gyakorolt hatását. Elsőként a fagocitotikus aktivitásában bekövetkező változásokat tanulmányoztuk, melyet élesztő partikulumok segítségével tudtuk kvantifikálni. Stimuláció nélkül egyetlen mikroglia sejtek átlagosan 15±1 élesztőt kebelezett be a 60 perces inkubáció alatt (14/A. ábra). A fagocitózis intenzitása 24±2-re nőtt mesenchymalis őssejtek jelenlétében, amely szignifikáns különbségnek bizonyult. Endotoxin (vagyis bakteriális lipopoliszacharid) jelenlétének sem alacsony (0,1 µg/ml), sem magasabb (10 µg/ml) koncentrációban alkalmazva sem volt számottevő hatással a mikroglia sejtek élesztő fagocitózisára, és nem befolyásolta az MSC-k fagocitózist fokozó hatását sem. A 14/B és C. ábrán szereplő két reprezentatív felvételen jól látható, hogy a kontrollhoz képest az MSC-k jelenléte milyen intenzíven fokozta a mikroglia sejtek élesztő fagocitózisát.

Ezután megvizsgáltuk, hogy miként változik a mikroglia sejtek citokin termelése élesztő illetve apoptotizáló thymocyták fagocitózisát követően, MSC-k egyidejű jelenlétében vagy a nélkül. A potenciális patogénként érzékelt élesztő partikulumok bekebelezését követően a mikroglia sejtek jelentős mennyiségű TNF-α-t szekretáltak, azonban IL-10 termelésükben nem történt változás (15. ábra), tehát ebben az esetben a gyulladáscsökkentő citokin javára tolódott el az egyensúly. Ezzel szemben apoptotizáló thymocyták fagocitózisát követően nem tapasztaltunk semmilyen változást a citokin termelésben. A mikroglia és MSC kokultúrák felülúszóiban azonban nagy mennyiségű IL-10 volt kimutatható, ami a milió immunszuppresszív irányba való eltolódását jelzi.

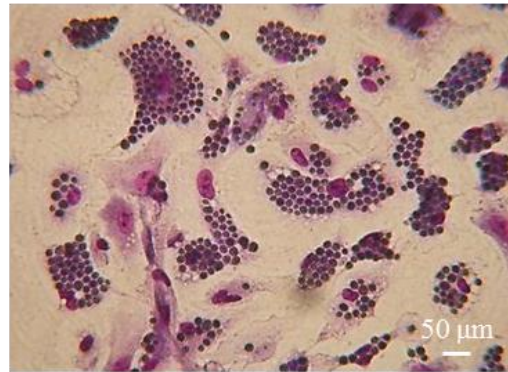
A



B

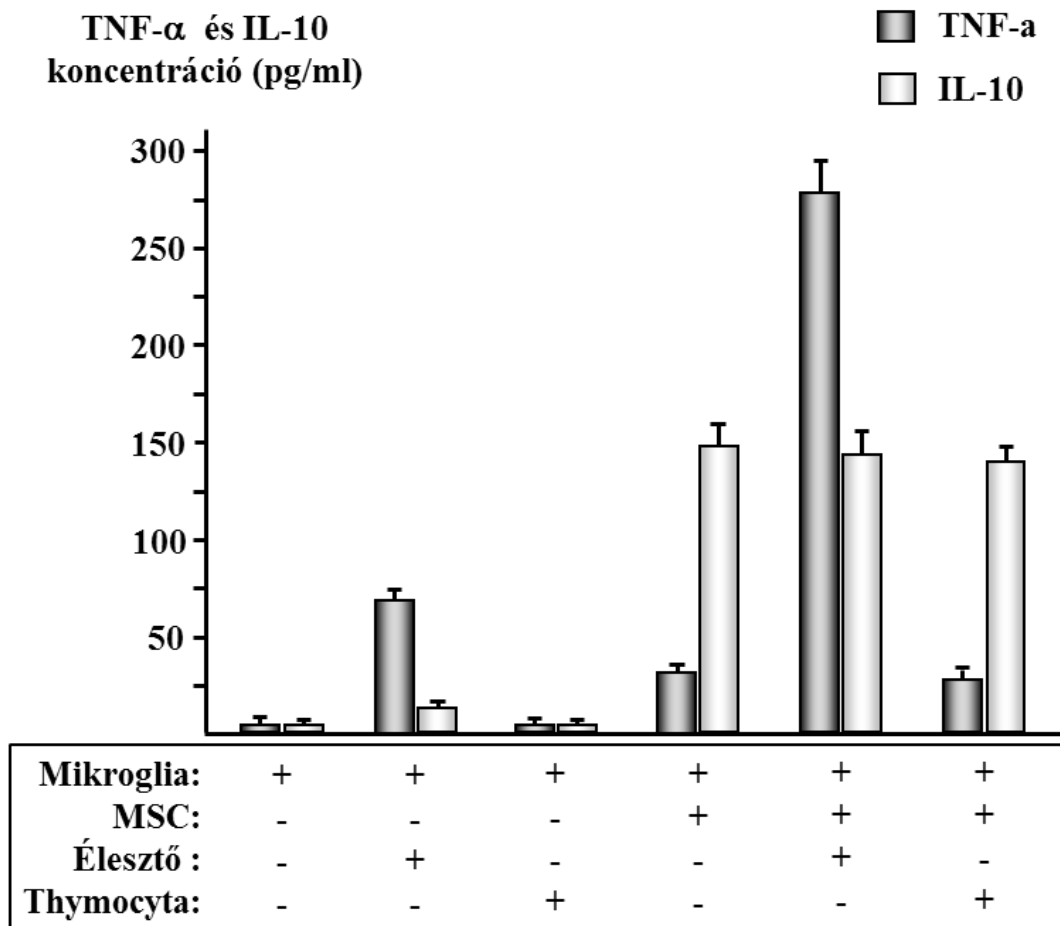


C



14. ábra. A mikroglia sejtek élesztő fagocitózisában bekövetkező változások mesenchymalis őssejtek és/vagy bakteriális endotoxin jelenlétében. 10^5 mikroglia sejtet 48 órán keresztül tenyésztettünk 10^4 csontvelői eredetű MSC és/vagy lipopoliszacharid (LPS) különböző koncentrációinak jelenlétében, majd 5×10^6 élesztősejtet adtunk hozzájuk. 1 óra elteltével fixáltuk és Giemsa oldattal festettük meg a sejteket. (A) Mikroglia sejtek élesztő felvételének intenzitása a különböző kezelések függvényében ($n=100$), ** $p < 0,01$ a kontrollhoz képest. Mikroglia (B) illetve MSC-vel együtt tenyésztett mikroglia(C) sejtek reprezentatív fotója élesztő fagocitózisát követően.

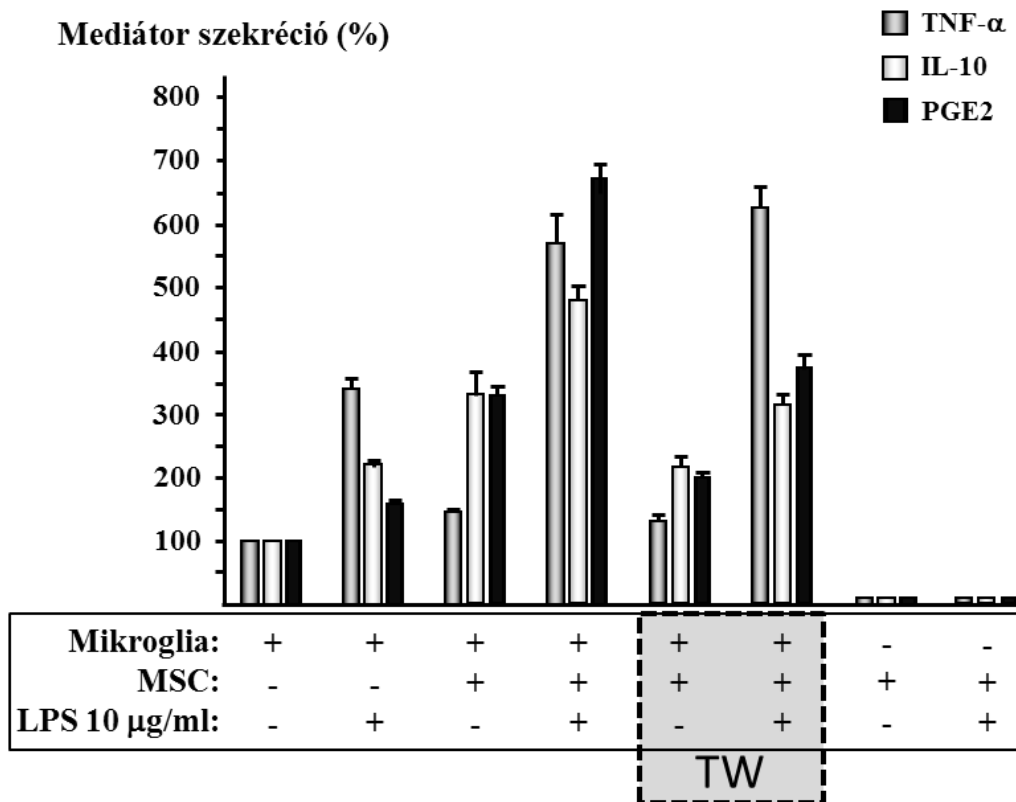
Ha a mikroglia sejteket MSC-k jelenlétében fagocitáltattuk, akkor élesztő bekebelezésének hatására továbbra is a TNF- α termelés dominált, míg apoptotizáló sejtek fagocitózisát követően az IL-10 szekréció vált uralkodóvá.



15. ábra. A mikroglia sejtek citokin termelése eltérő élesztő illetve apoptotizáló sejtek fagocitózisa után. 10^5 mikroglia sejtet inkubáltunk 48 órán keresztül 10^4 csontvelői eredetű MSC jelenlétében vagy anélkül, élesztő vagy apoptotizáló thymocyta fagocitózisát követően. A tenyésztési idő elteltével gyári, kvantitatív ELISA kitek segítségével mértük meg a felülúszókban a TNF- α és az IL-10 koncentrációját. Az eredményeket átlag \pm szórás formában ábrázoltuk (n=3).

3.3 A mikroglia sejtek citokin termelése MSC-k jelenlétében

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy endotoxin jelenléte miként befolyásolja az MSC-k mikroglia sejtek citokin termelésére gyakorolt hatását. Ahogy azt korábban élesztő partikulumok fagocitózist követően is tapasztaltuk, a kontrollhoz képest bakteriális eredetű LPS jelenlétében is fokozódik a mikroglia sejtek TNF- α termelése (16. ábra), míg az IL-10 és PGE2 termelésben nem tapasztalunk számottevő változást.

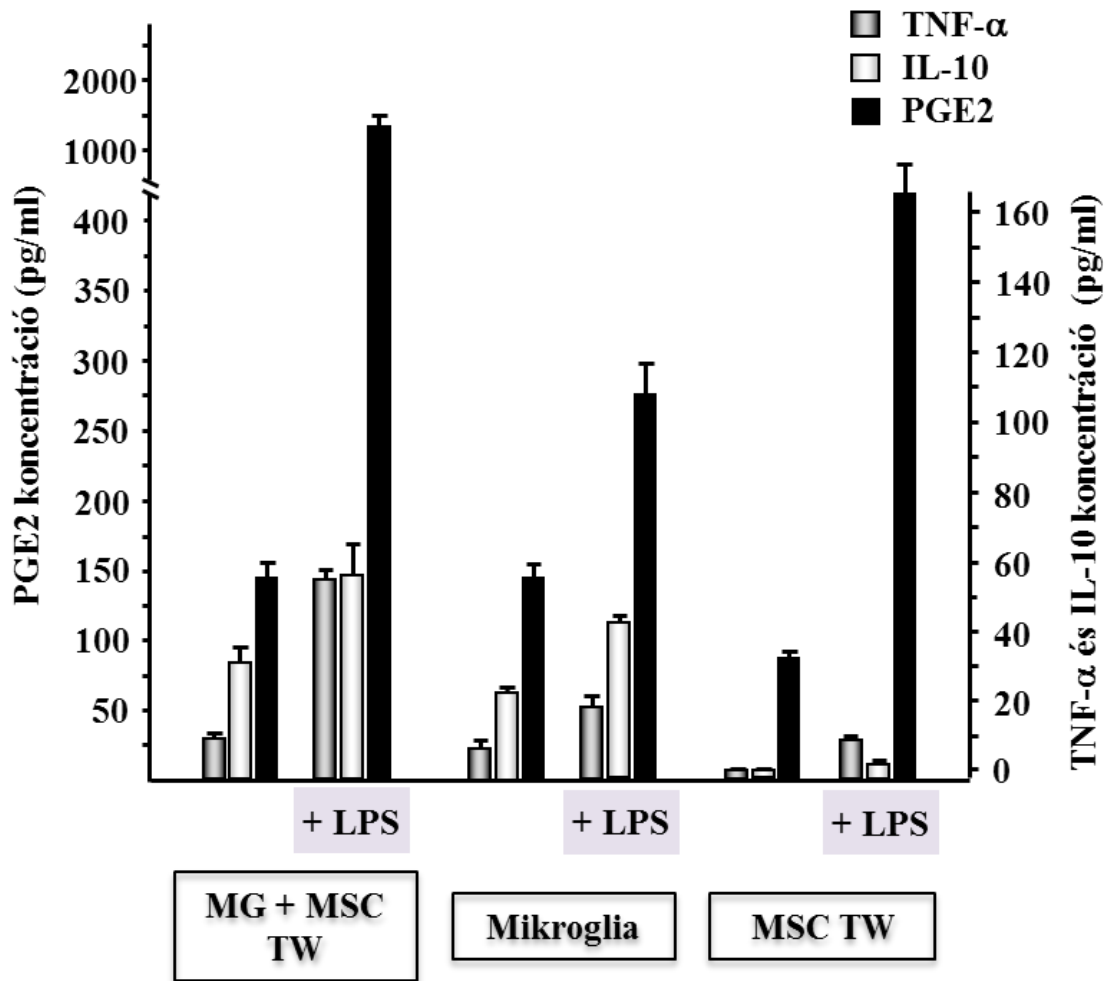


16. ábra. A TNF- α / IL-10 arány eltolódik az IL-10 javára a mikroglia és MSC-t is tartalmazó sejt kultúrák felülúszóiban. 48 órán keresztül inkubáltunk 10^5 mikroglia sejtet 10^4 csontvelői eredetű MSC illetve 10 μ g/ml LPS jelenlétében vagy anélkül, a feltüntetett kombinációk szerint. TW rövidítéssel azokat a kísérleteket jelöltük meg, amelyek során a kétféle sejtípust 1 μ m pórusátmérőjű féligáteresztő hártyával választottuk el egymástól. A tenyésztési idő elteltével gyári, kvantitatív ELISA kiték segítségével mértük meg felülúszókban a TNF- α , IL-10 és PGE2 koncentrációt. A mikroglia sejtek önmagukban mérhető mediátor termelését 100 %-nak tekintve átlag \pm szórás formában ábrázoltuk a citokinek termelésében bekövetkező változásokat. (n=3).

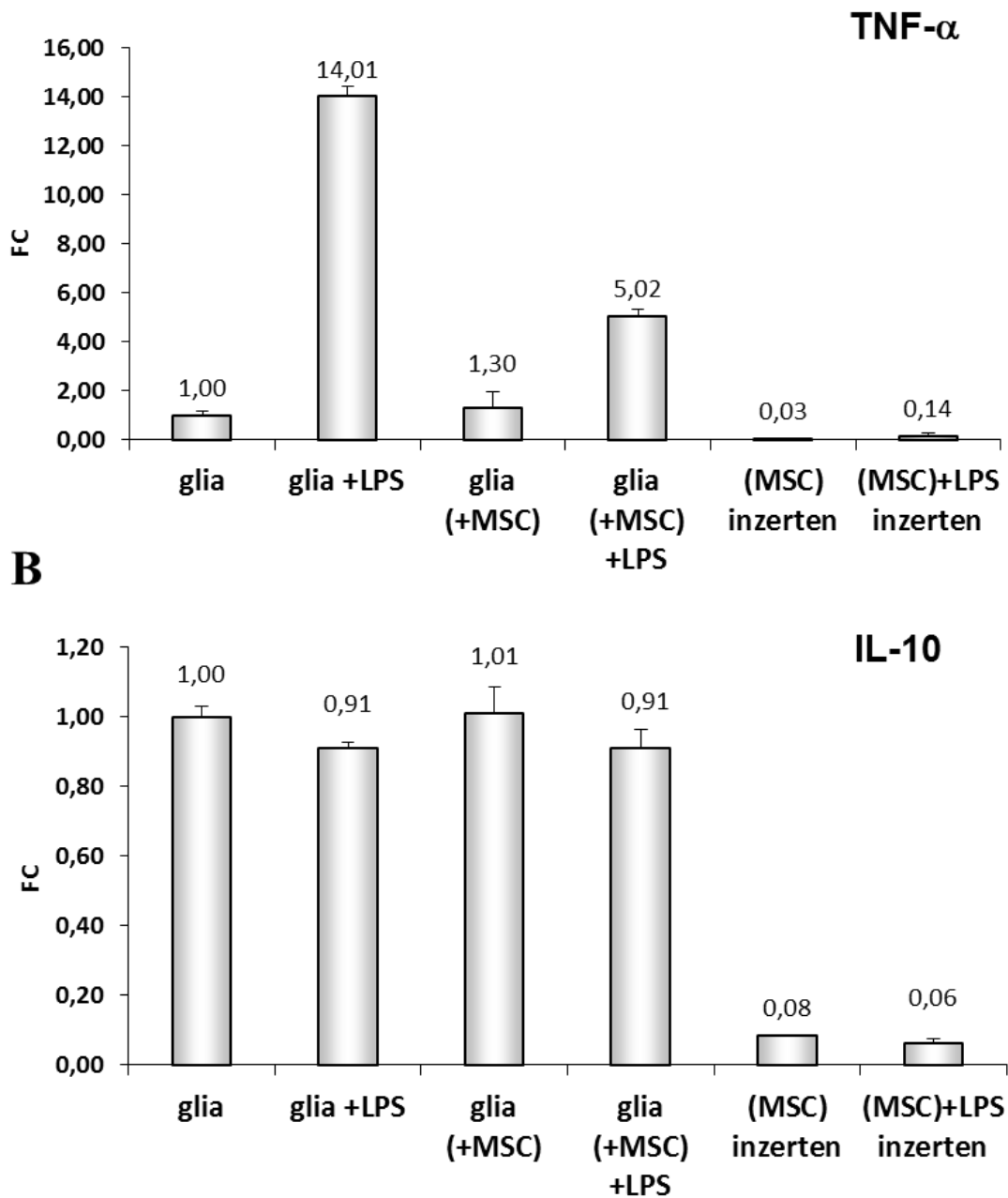
Ezzel szemben MSC-k jelenlétében a két utóbbi mediátor termelése fokozódott jelentős mértékben. Ha az őssejteket és az LPS-t együtt adtuk a mikroglia sejtekhez, mindhárom citokin esetén fokozott szekréciót tapasztaltunk. Ha a kétféle sejtípust térben elválasztottuk egymástól transwell (TW) elrendezésű kultúrákban, akkor a felülúszókban csökkent a gyulladásgátló mediátorok (az IL-10 és a PGE2) mennyisége, azonban ha LPS is jelen volt a kultúrákban, akkor ezzel párhuzamosan megemelkedett a TNF- α termelés is. Fontos megjegyeznünk azt is, hogy a kísérlet során az IL-10 és PGE2 termelés párhuzamosan változott az MSC-t és mikroglia is tartalmazó kultúrák felülúszóiban.

Ahhoz, hogy kiderítsük a kokultúrákban mely sejtípus termeli a fent említett pro- és anti-inflammatorikus citokineket a következő kísérletet végeztük el: mikroglia és MSC-t is tartalmazó ko-kultúrákat készítettünk transwell elrendezésben, ahol az MSC-eket inzeretekben helyeztük el, majd 48 óra elteltével médiumot cseréltünk. A minták felében együtt hagytuk a két sejtípust, míg a másik felében elválasztottuk őket egymástól azáltal, hogy az MSC-eket tartalmazó betéteket új, üres lyukakba helyeztük át. Újabb 24 óra inkubációs idő elteltével mintákat vettünk a felülúszókból és megmértük azokban a citokin szinteket. Az eredményekből kitűnik, hogy a TNF- α és IL-10 zömét a mikroglia sejtek termelték (17. ábra), míg a mesenchymalis őssejtek csak PGE2-t szekretálnak számottevő mennyiségben.

Ezt követően transwell elrendezésű kultúrákból egymástól elkülönítve izoláltuk és tisztítottuk a mikroglia és MSC sejtek RNS-eit, majd reverz transzkripciót követően real-time PCR reakciókban mértük a génexpressziót. Mikroglia sejtek esetében az endotoxin jelenléte tizennégyszeresére emelte a TNF- α mRNS mennyiségét (18. ábra). Az LPS génexpresszió fokozó hatása MSC-k jelenlétében sokkal mérsékeltebb, ez esetben csak ötszörös emelkedést tapasztaltunk. (Az MSC-k jelenlétének önmagában nincs szignifikáns hatása a TNF- α génexpresszióra.) Az IL-10 mRNS-ek mennyiségének vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy sem LPS, sem MSC-k jelenlétében nem következik be szignifikáns változás a vizsgálat 5 órás időtartama alatt. A MSC-kben a mikrogliahoz képest elenyésző mértékben fejeződnek csak ki a TNF- α és IL-10 gének attól függetlenül, hogy önmagukban vagy gliasejtekkel közös transwell kultúrákban tenyésztettük őket (18. ábra), továbbá LPS jelenléte sem képes számottevően fokozni az MSC-k nevezett génjeinek expresszióját.



17. ábra. A mesenchymalis őssejtek és mikroglia sejtek citokin termelése transwell kultúrákban. 10^5 mikroglia sejtet és 10^4 csontvelői eredetű MSC-t tenyésztettünk transwell (TW = a kétféle sejtípust $1\ \mu\text{m}$ pórusátmérőjű féligáteresztő hártával térben elválasztottuk egymástól) elrendezésben $10\ \mu\text{g/ml}$ LPS jelenlétében vagy anélkül, 48 órán keresztül. Ezután lecseréltük a tenyésztő médiumot, majd a minták felében a kétféle sejtípust egyazon lyukban hagytuk (MG + MSC TW), míg a minták másik felében az MSCk-eket új, üres lyukba helyeztük át (MSC TW), és ezzel elkülönítettük azokat a mikroglia sejtektől. További 24 óra inkubációt követően mintákat vettünk a felülúszókból és gyári, kvantitatív ELISA kitek segítségével megmértük a TNF- α , IL-10 és PGE2 koncentrációjukat. Az ábrán átlag \pm szórás formában jelenítettük meg a citokinek termelésében bekövetkező változásokat. (n=3).



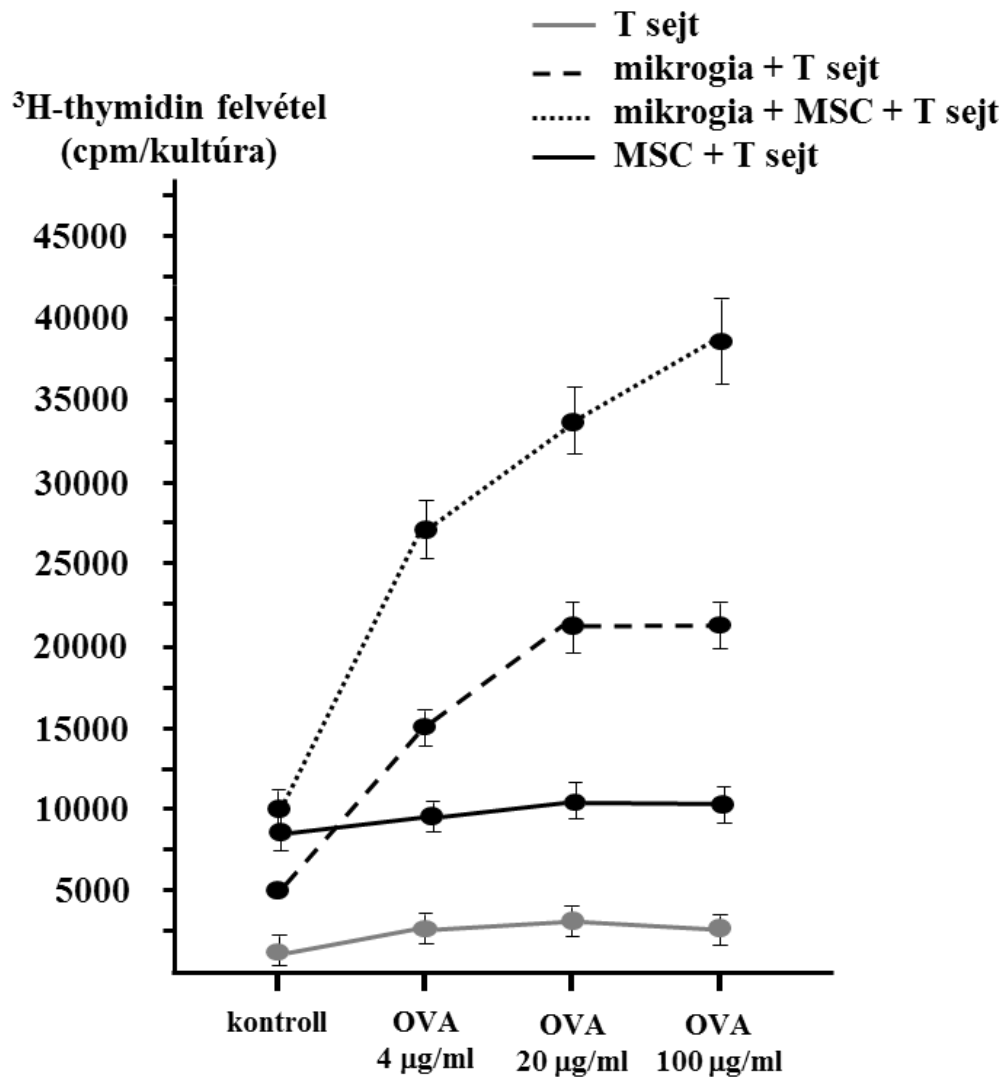
18. ábra. A mesenchymalis őssejtek és mikroglia sejtek génexpressziós mintázata transwell kultúrákban. 10^5 mikroglia sejtet és 10^4 csontvelői eredetű MSC-t tenyésztettünk transwell elrendezésben 10 μ g/ml LPS jelenlétében vagy anélkül, 5 órán keresztül. Trizolos mintavételt követően izoláltuk és tisztítottuk a mikroglia és MSC sejtek RNS-eit, majd reverz transzkripciót követően real-time PCR reakciókban mértük a génexpressziót. Az ábrán átlag \pm szórás formában jelenítettük meg a TNF- α (A) és IL-10 (B) gének expressziójában bekövetkező változást (n=3).

Tehát génexpressziós vizsgálataink is alátámasztják azt a megállapításunkat, miszerint a sejt kultúra felülúszókban mérhető TNF- α és IL-10 döntő többségét a mikroglia sejtek termelik.

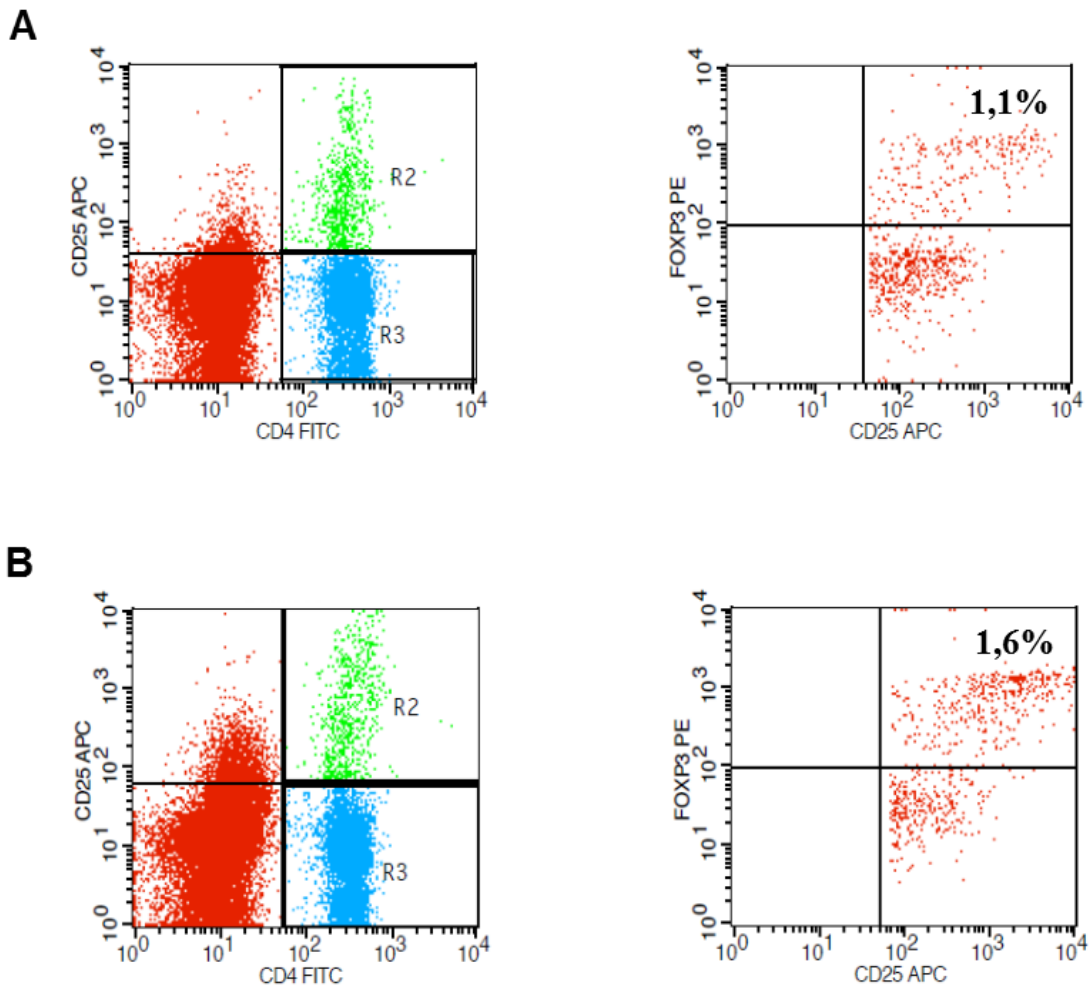
3.4 Az MSC-k hatása a mikroglia sejtek antigén bemutató képességére

A mikroglia sejtek antigén-bemutató képességét ovalbumin (OVA) – specifikus T-sejtek és OVA különböző koncentrációinak (4; 20; 100 $\mu\text{g/ml}$) jelenlétében vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy mikroglia sejtek hatására a kontrollhoz képest (közepes és magas antigén koncentráció esetén) erősen fokozódik a T sejtek proliferációja (19. ábra), tehát a gliasejtek hatékonyan prezentálják az ovalbumint, ami osztódásra készíteti az erre specifikus limfocitákat. Mesenchymalis őssejtek egyidejű jelenlétében még tovább nő a per centenkénti beütésszám, vagyis az MSC-k fokozzák a mikroglia sejtek antigén prezentáló képességét. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, hogy a mikroglia sejtek antigén-bemutató képességében kulcsszerepet játszó sejt felszíni molekulák, vagyis az MHC-II és a CD86 expressziója (intenzitását és a pozitív sejtek arányát tekintve is) fokozódik MSC-k jelenlétében (nem mutatjuk).

Ehhez kapcsolódóan megvizsgáltuk, hogy miként változik ezekben a kultúrákban a regulátor T sejtek aránya. Azt tapasztaltuk, hogy a CD4+CD25+ kettős pozitív sejtek között az MSC-t is tartalmazó kultúrákban $1,1 \pm 0,1$ %-ról $1,6 \pm 0,2$ %-ra nőtt a regulátor T sejtek száma (20. ábra). Ez ugyan kismértékű, de reprodukálható változás volt.



19. ábra. A mesenchymalis őssejtek fokozzák a mikroglia sejtek antigén prezentáló képességét. 10^4 ovalbumin (OVA)-specifikus T-sejthez 10^4 mikroglia (antigén prezentáló) sejtet, 10^3 MSC-t, valamint OVA különböző koncentrációit adtunk a feltüntetett kombinációkban. 4 nap tenyésztést követően ^3H -timidinnel jelöltük a sejteket és folyadék scintillátorban megmértük a percenkénti beütés számot (cpm) Az ovalbuminnal előaktivált T-sejtek proliferációjának változását átlag \pm szórás formában ábrázoltuk a kultúrákhoz adott ovalbumin koncentrációjának függvényében. (n=3).

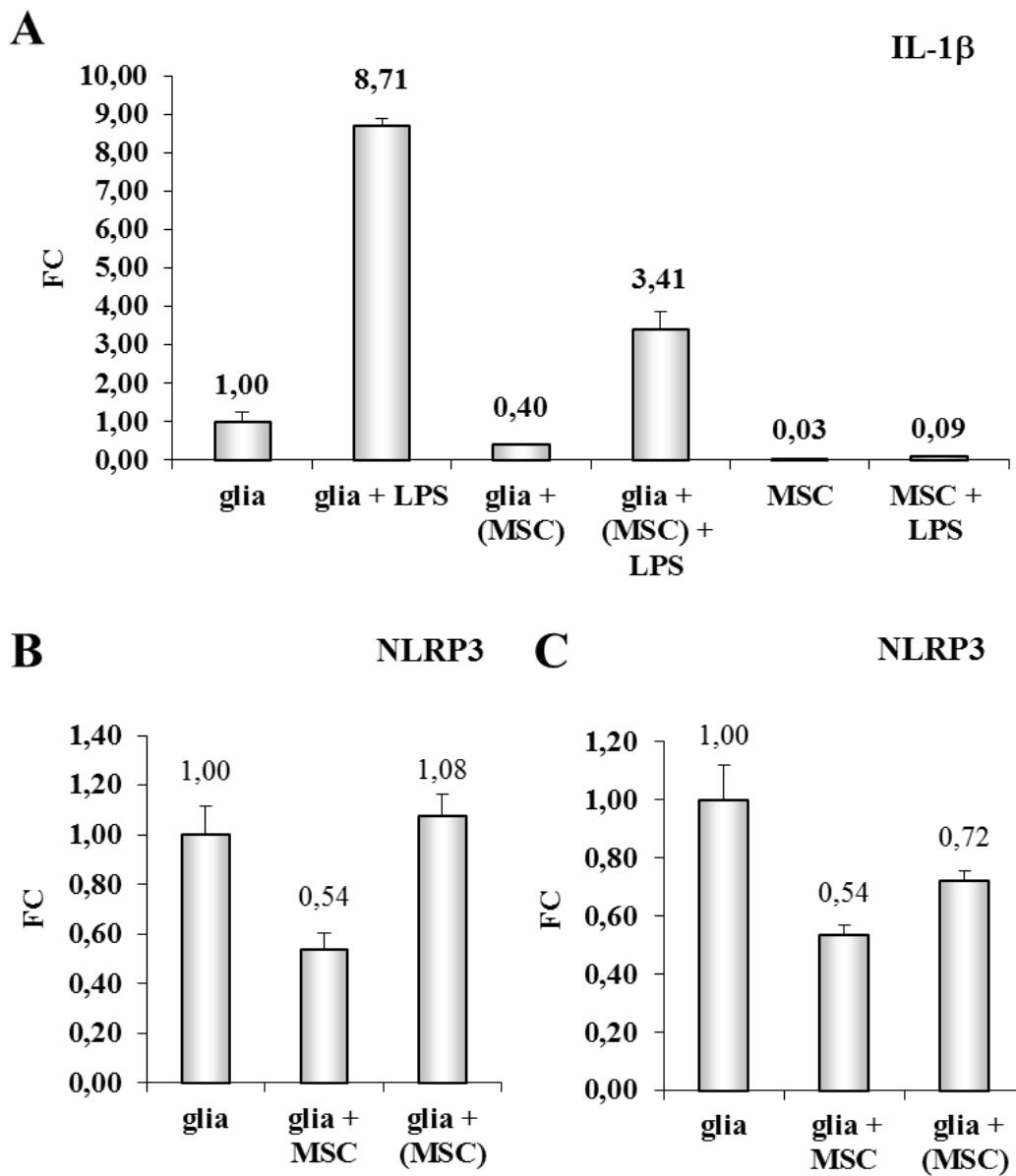


20. ábra. Az MSC-mikroglia kokultúrákban megnő a $CD4^+CD25^{high}Foxp3^+$ regulátor T-sejtek száma. 2×10^5 ovalbumin (OVA)-specifikus T-sejthez 2×10^5 mikroglia (antigén prezentáló) sejtet valamint 20 mg/ml OVA-t adtunk önmagában (A) vagy 2×10^4 mesenchymalis őssejt jelenlétében (B). 4 nap elteltével az izolált limfocitákat Mouse Regulatory T Cell Staining kittel jelöltük meg, majd áramlási citométerben mértük a fluoreszcencia intenzitást. Három párhuzamos mérés közül egy reprezentatívnek tekinthető kísérlet eredményét mutatjuk.

3.5 Az inflammaszómák szerepe a mikroglia-*MSC* kölcsönhatásban

A mikroglia sejtek és a mesenchymalis sejtek közötti kölcsönhatás alaposabb vizsgálatakor több különféle mediátor (IL-1 α , IL-1 β , IL-6, Arg-1 és MCP1) génexpresszióját vizsgáltuk meg (nem mutatjuk). Ezek közül szeretném kiemelni az IL-1 β -t, amely különösen érdekesnek bizonyult. Ahogy a 21/A. ábrán látható, LPS hatására a várankozásoknak megfelelően (a TNF- α -nál tapasztaltakhoz hasonlóan) ennek a gyulladáshos citokinnek a kifejeződése is drasztikusan megemelkedik, *MSC*-k jelenlétében azonban szignifikánsan lecsökken (a TNF- α kifejeződésében ez esetben nem tapasztaltunk számottevő változást, lásd a 18. ábrán). Az is nyilvánvalóvá vált, hogy a mesenchymalis össejtek ezt a citokint sem fejezik ki, endotoxin hatásra sem. Ezek az eredmények felvetették annak lehetőségét, hogy az *MSC*-k a mikroglia sejtek inflammaszómáin keresztül, azokra (is) hatva fejtik ki immunuszuppresszív aktivitásukat.

Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a mikroglia sejtek NLRP3 (NLR család pirin domain tartalmú fehérje 3; más néven NALP3-nak) expresszióját is. A sejt kultúrák elindítását követő 5. órában vett mintákban azt tapasztaltuk, hogy *MSC*-k jelenlétében a felére csökken le az NLRP3 expressziója, de csak abban az esetben, ha a két sejtípust együtt tenyésztettük, míg ha térben szeparáltuk őket, akkor az *MSC* jelenlétének nem volt semmilyen hatása (21/B. ábra). Ha azonban a trizolos mintavétel idejét kitöltük 24 órára, akkor már az inzerthes kultúrákban is szignifikánsan csökkent a NLRP3 expressziója. Tehát az *MSC*-k jelenléte hatékonyan képes gátolni a gliasejtben az inflammaszómák felépítésében kulcsszerepet játszó NLRP3 gén kifejeződését és ezzel párhuzamosan csökken az IL-1 β expressziója is.



21. ábra. A mesenchymalis őssejtek és mikroglia sejtek génexpressziós mintázata transwell kultúrákban II. 10^5 mikroglia sejtet és 10^4 csontvelői eredetű MSC-t tenyésztettünk transwell elrendezésben $10 \mu\text{g/ml}$ LPS jelenlétében vagy anélkül, 5 (A, B) vagy 24 órán (C) keresztül. Trizolos mintavételt követően izoláltuk és tisztítottuk a mikroglia és MSC sejtek RNS-eit, majd reverz transzkripciót követően real-time PCR reakciókban mértük a génexpressziót. Az ábrán átlag \pm szórás formában jelenítettük meg az IL-1 β (A) és az NLRP3 (B és C) gének expressziójában bekövetkező változást ($n=3$).

Megbeszélés

Kísérleti eredményeink tanulsága szerint lehetséges egér csontvelőből, zsírszövetből, lépből, thymusból, és az aorta falból is olyan sejtpopulációkat izolálni, amelyek (i) fibroblast-szerű morfológiával jellemezhetőek, (ii) a tenyésztőedények falához kitapadva nőnek és (iii) hasonló, de nem teljes mértékben azonos sejtfelszíni markereket fejeznek ki, valamint (iv) adipocita és osteoblast irányba is képesek differenciálódni, tehát jelenlegi ismereteink szerint mesenchymalis ős-, vagy stroma sejteknek tekinthetők. Ezt a megfigyelésünket számos irodalmi adat is alátámasztja [6, 7], ami arra enged következtetni, hogy a mesenchymalis őssejtek valójában minden szervünkben, illetve szövetünkben megtalálhatóak.

Az imént megfogalmazott hasonlóságok ellenére funkcionális szempontból jelentős különbségeket találtunk a különböző testtájokról származó stroma sejt populációk között. A csontvelő, zsírszövet és lép eredetű MSC-k erősen (kb. 70%-ban) képesek gátolni a T limfociták proliferációját *in vitro* kultúrában (5. ábra), az aorta fal eredetű MSC-k gátló aktivitása ennél mérsékeltebb (kb. 40%-os), míg a thymus eredetű sejtek sem a mitogén (ConA), sem az alloantigén (MLR) indukált T-sejt osztódást nem képesek befolyásolni. Hasonló jelenséget tapasztaltunk korábban *in vivo* is [78], hiszen a thymus eredetű MSC-k immunszuppresszív aktivitás híján képtelenek meggyógyítani az STZ indukált diabéteszben szenvedő egereket, az aorta fal eredetű MSC-k részleges T-sejt proliferáció gátló képessége azonban elegendő a terápiás hatás kifejtéséhez.

Az immunszuppresszív képességben tapasztalt ezen lényegi különbség hátterében feltehetően az áll, hogy a mesenchymalis őssejtek alkalmazkodnak *in situ* mikrokozonyukhoz (és „emlékeznek” arra a sorozatos *in vitro* átoltásokat követően is), vagyis a thymusból származó MSC-k vélhetően szöveti eredetükből kifolyólag képtelenek gátolni a T limfociták proliferációját. Ez funkcionális szempontból érthető, hiszen a thymusban zajló sikeres T-sejt szelekció egyik előfeltétele a nagyszámú progenitor T-sejt keletkezése, amelyhez a thymociták intenzív proliferációja elengedhetetlenül szükséges.

A különböző testtájokról származó stroma sejt populációk génexpressziós mintázatát összehasonlító kutatási eredményeink [85] is megerősítettek minket abban, hogy okfejtésünk helytálló, és az MSC-k határozott pozicionális memóriával

rendelkeznek. Idézett közleményünkben bemutatott (de ebben az értekezésben nem részletezett) eredményeink szerint a mesenchymalis őssejtek még 10-15 *in vitro* átoltást követően is megőrzik egyedi Hox génexpressziós mintázatukat és továbbra is kifejeznek néhány, az adott szervre vagy testszelvényre jellemző, kulcsfontosságú transzkripciós faktort kódoló gént. Ilyen gének például a csak thymus eredetű sejtjeinkben megjelenő *Tbx5* (amely ennek a szervnek a fejlődéséhez nélkülözhetetlen [86]), a femurból izolált MSC-inkben kifejeződő *Pitx1* (amelyet a hátsó végtagok fejlődésében játszik kulcsszerepet [87]), vagy a lép stroma sejtjeire jellemző *Tlx1* (amely a nevezett szerv organogenezise során meghatározó [88]). Tehát a különböző eredetű mesenchymalis őssejt populációk részben eltérő génexpressziós mintázata a sejtek eredeti (*in situ*) anatómiai lokalizációját tükrözi. Eredményeink az MSC-k terápiás célú felhasználása során is jelentősek lehetnek, hiszen a szöveti regeneráció során meghatározó lehet, hogy a beültetésre kerülő őssejt-graft és a kezelni kívánt célszerv/szövet pozicionális memóriája mennyire tér el egymástól [89].

A mesenchymalis őssejtek terápiás szempontból legígéretesebb sajátossága immunszuppresszív és gyulladásgátló képességük [19], amelyben irodalmi adatok tanulsága szerint a kis molekulású, zsírdékony prosztaglandin E2-nek mind *in vitro* [33], mind pedig *in vivo* [44, 90] jelentős szerepe van. Azonban máig nem tisztázott pontosan, milyen jelátviteli folyamatok szabályozzák az MSC-k PGE2 termelését. Szolubilis mediátorok [91, 92] mellett a sejt-sejt kontaktus [93, 94] befolyásoló szerepe is felmerült, de az eredmények sokszor egymásnak ellentmondóak. Annyit biztosan tudunk, hogy a PGE2 arachidonsavból kiinduló szintézisét a ciklooxygenáz enzim két izoformája (COX-1 és COX-2, másnéven prosztaglandin H szintáz-1 és -2) katalizálja. Normál, fiziológiás körülménye között a PGE2 alapszintű termeléséért a folyamatosan expresszálódó COX-1 felelős, míg gyulladást előidéző behatáskor a COX-2 izoforma megjelenése és működése biztosítja a prosztaglandin E2 szint gyors megemelkedését [95].

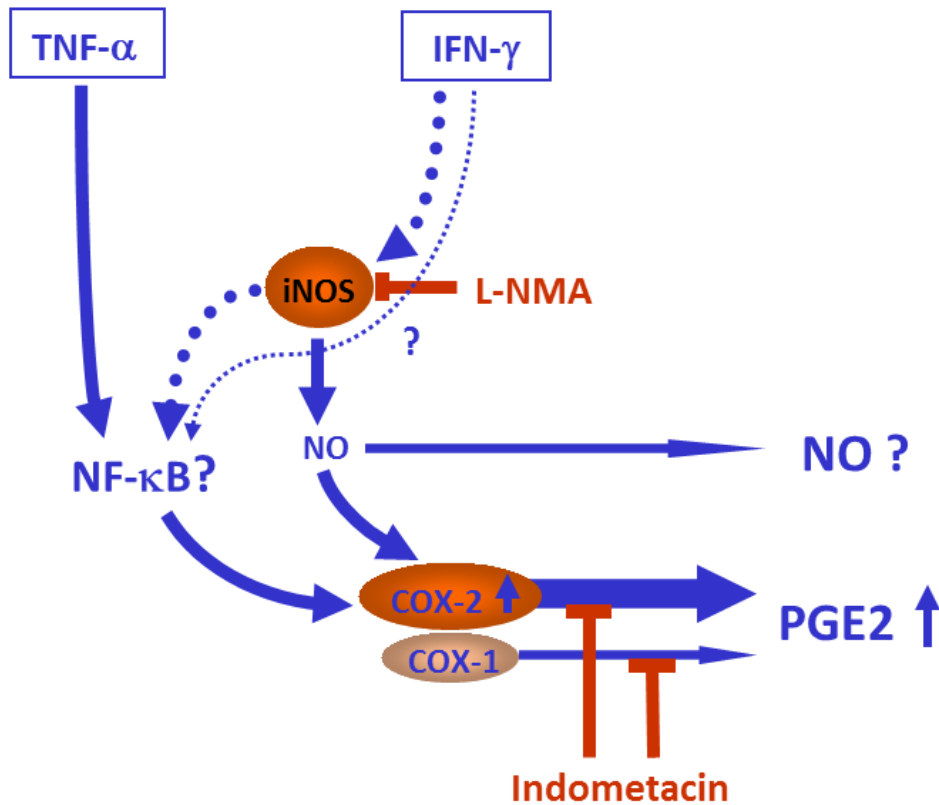
Munkánk során sikerült bebizonyítanunk, hogy az egér csontvelőből és alhasi zsírszövetből izolált MSC-k folyamatosan termelnek PGE2-t, amelynek mennyisége jelentősen megemelkedik aktivált T sejtek, valamint gyulladásgátló citokinek meghatározott kombinációjának jelenlétében. Tapasztalataink szerint a ConA aktivált T

sejtek jelenlétében tapasztalható PGE2 szekréció fokozódás elmarad, ha a két sejttípust féligáteresztő hártával (transwell elrendezésben), térben elválasztjuk egymástól. A COX-1 és -2 enzimek indometacinnal történő gátlásakor az MSC-k PGE2 szekréciója szinte teljesen megszűnik, míg a NOS enzim L-NMA-val előidézett blokkolásának nincs hatása a PGE2 termelésre. Ezek az eredmények korábbi irodalmi adatokkal [96] együtt arra engednek következtetni, hogy a sejt-sejt kölcsönhatás kulcsfontosságú ahhoz, hogy az aktivált T sejtek fokozzák az MSC-k PGE2 termelését, míg ebben a folyamatban a NO-nak nincs meghatározó szerepe. Ez természetesen nem zárja ki annak lehetőségét, hogy az MSC-k immunszuppresszív viselkedéséhez más kísérleti körülmények között az iNOS enzim aktivitása tevőlegesen hozzájárulhat [97, 98]. Munkánk során nem állt módunkban mélyebben vizsgálni a COX-2 enzim működésének (sejtkontaktus-függő) fokozásában szerepet játszó sejtfelszíni jelátvivő molekulákat, irodalmi adatok [93] alapján azonban nagy valószínűséggel az MSC-k felszínén kifejeződő B7-H1 (PDL1) és B7-H4, vagy esetleg egy Notch ligandum (Jagged1) áll a jelenség hátterében.

Eredményeink alapján kijelenthetjük továbbá, hogy a szolubilis, rekombináns TNF- α önmagában is, dózis függően képes fokozni az MSC-k PGE2 termelését. A TNF- α hatását az IFN- γ egyidejű jelenléte rendkívül hatékonyan képes fokozni, utóbbi citokin azonban önmagában alkalmazva nem indukál PGE2 szekréciót. A két citokin között tehát olyan szinergisztikus kölcsönhatás figyelhető meg, amihez hasonlóan korábban, pl. a RANTES [99], a CXCL10 [100], és az intercelluláris adhéziós molekula-1 [101, 102] mRNS-ek expressziójának indukciója során figyeltek meg leukocitákban. Továbbá az is bizonyossá vált, hogy az MSC-k immunszuppresszív aktivitásának előmozdításához az IFN- γ mellett a TNF- α , az IL-1 α vagy az IL-1 β egyidejű jelenléte szükséges, amelynek hatására megnő a COX-2 enzim génjének expressziója [92].

Kísérleteink tanulsága szerint a NOS enzim gátlása nem befolyásolta a TNF- α PGE2 termelést fokozó hatását, de – meglepő módon – részlegesen prosztaglandin termelés csökkenést figyelhattunk meg a mindkét citokint tartalmazó MSC kultúrákban. Ennek értelmében az IFN- γ PGE2 szekréciót fokozó hatása MSC-ken részben NO függő módon valósul meg. A citokinnel kezelt MSC kultúrák felülúszóiban mérhető alacsony

nitrit koncentráció arra enged következtetni, hogy a NO – ez a nagyon labilis, rövid útvonalon az IFN- γ -hoz képest feltehetően „downstream” helyzetben hat (22. ábra).

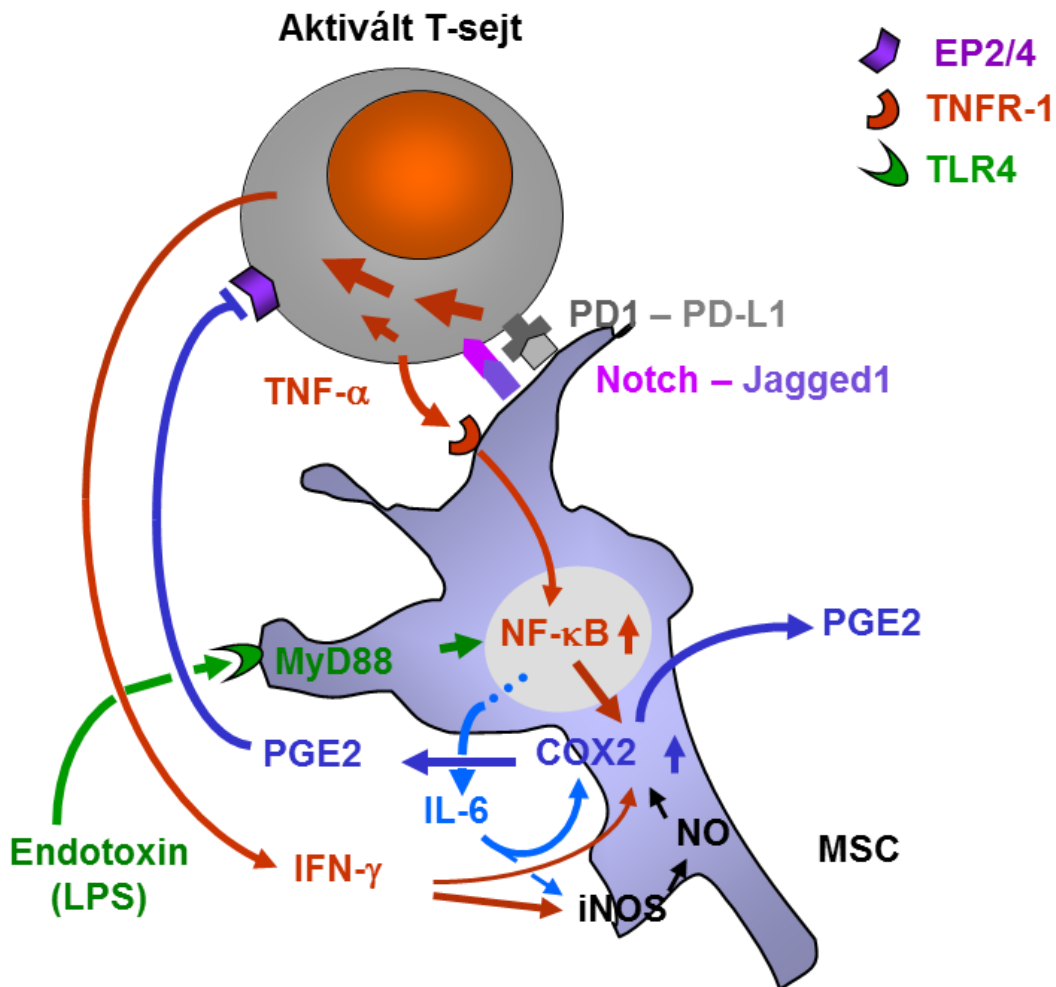


22. ábra. A mesenchymalis őssejtek proszttaglandin E2 termelésének szabályozása gyulladásos citokinek jelenlétében.

Felvetődik azonban a kérdés: vajon miért elengedhetetlenül szükséges a közvetlen sejt-sejt kontaktus ahhoz, hogy az aktivált T sejtek fokozzák az MSC-k PGE2 termelését *in vitro* kultúrában, noha ezzel ellentétben a kívülről bevitt rekombináns citokinek azonnali COX-2 aktiváló hatással rendelkeznek? Az egyik lehetséges magyarázat szerint a kokultúrákba a limfociták és MSC-k kétirányú („licensing-jellegű”) kapcsolata szükséges ahhoz, hogy a T sejtek pro-inflammatorikus citokineket termeljenek és ezzel fokozzák az MSC-k COX-2 génextpresszióját, és végeredményként azok PGE2 termelését is.

Tehát eredményeink tanulsága szerint a csontvelői és zsírszövet eredetű MSC-k aktivált T sejtek vagy gyulladásos citokinek jelenlétében nagy mennyiségű

prostaglandin E2 termelésére képesek, ami potenciális immunszuppresszív mediátornak tekinthető. Az MSC-k PGE2 termelését azonban nem egy kitüntetett mediátor vagy nem-redundáns molekuláris mechanizmus szabályozza. Több jelátviteli rendszer együttesen képes pontosan és precízen, az adott igényeknek megfelelően finom-hangolni ennek az immunszuppresszív lipid-származéknak a szekrécióját (23. ábra).



23. ábra. A mesenchymalis őssejtek PGE2 termelésének szabályozása aktivált T sejtek jelenlétében

A mesenchymalis őssejtek előbbiekben vázolt immunszuppresszív és gyulladásgátló képességét leginkább olyan betegségek esetén lenne érdemes terápiás szempontból is kihasználni, amelyek során a károsodott szövet regenerációja mellett a gyulladósos és autoimmun folyamatok gátlása egyaránt fontos. Ilyen betegség az emberi

sclerosis multiplex, amely a leggyakrabban előforduló központi idegrendszeri gyulladáson alapuló kórkép. A patomechanizmus ok-okozati összefüggései még nem tisztázottak pontosan, annyi azonban bizonyos, hogy a betegség egy adott szakaszában az autoimmun gyulladáson alapuló folyamatok fontos szerepet játszanak, amelyet a mielinhüvelyt alkotó oligodendrocyták tömeges pusztulása kísér [103]. Ez vetette fel az MSC-k felhasználásán alapuló őssejtterápiás eljárás lehetőségét, így a sclerosis multiplex egy preklinikai állatmodelljét (a kísérletes autoimmun encephalomyelitist) mi magunk is tanulmányoztuk.

Azt tapasztaltuk, hogy a kezeletlen kontroll csoporthoz képest a 7. napon mesenchymalis őssejt adásával kezelt egerek a betegség első fázisában kissé rosszabbul vannak, majd ez a tendencia a 15. napon megfordul és az őssejt kezelt egerek sokkal enyhébb tüneteket mutatnak. Egy japán kutatócsoport eredményei [90] arra engednek következtetni, hogy a szekretálódó PGE₂-nek a betegség korai szakaszában gyulladást fokozó hatása van, míg később inkább immunszuppresszív aktivitást idéz elő. Jelen esetben is vélhetően ez állhat a háttérben, vagyis a mesenchymalis őssejt által termelt PGE₂ a beadást követően átmenetileg súlyosbítja a helyzetet, majd pár nap elteltével enyhíti a betegség lefolyását. Kutatási eredményeinkből arra következtethetünk, hogy mesenchymalis őssejt adásával eredményesen enyhíthető ez a gyulladáson alapuló folyamat. Az alkalmazhatóságot azonban jelentősen korlátozza az őssejt-kezelés kettős hatása. Elképzelhető, hogy a kezelés időpontjának, a beadás helyének vagy az alkalmazott sejtszámnak a módosításával ki lehetne küszöbölni a kezdeti, nem kívánt súlyosbító hatást. Éppen ezért további vizsgálatok szükségesek a módszer optimalizálásának érdekében.

Jelen disszertációban a terjedelmi korlátok miatt be nem mutatott eredményeink arra engednek következtetni, hogy az MSC-k közvetlenül a központi idegrendszeri immunológiai folyamatok szabályozásáért felelős sejteink, vagyis a mikroglia fejtik ki hatásukat. Ezért munkánk folytatásaként a mikroglia sejtek és az MSC-k kölcsönös egymásra hatását vizsgáltuk *in vitro* kultúrában.

A mikroglia sejtek az agyállomány specializálódott szöveti fagocita sejtjei, amelyek jelentős szerepet töltenek be a központi idegrendszer homeosztatis, gyulladáson alapuló regenerációs folyamataiban. Különböző behatásokra ezek az egyébként nyugvó állapotú

sejtek aktiválódnak, amelyet morfológiai és funkcionális változások sora kísér. Ennek következtében nagy számban termelnek olyan hatóanyag molekulákat, amelyek bizonyos esetben károsan hathatnak a környező sejtekre. Sclerosis multiplex és más, neurodegenerációval járó kórképekben már bizonyított tény, hogy a mikroglia sejtek által termelt mediátorok jelentősen hozzájárulnak a betegség kialakulásához vagy súlyosbodásához [104-106]. Éppen ezért olyan fontos a mikroglia sejtek különböző aktivációs állapotainak kutatása és az azt befolyásolni képes tényezők vizsgálata.

Kutatási eredményeink rávilágítanak arra, hogy a mesenchymalis őssejtek jelenléte is aktivációt idéz elő a mikroglia sejteken. Ennek első jelét a sejt morfológiai változása jelenti, hiszen azt tapasztaltuk, hogy MSC-k hatására a mikroglia sejtek a korábbi „nyugvó” sejthalak helyett aktivált vagy más néven amoeboid formát öltöttek (15. ábra). Ez együtt jár a sejt méret jelentős növekedésével is, illetve vélhetően ennek következménye az is, hogy a mikroglia sejtek élesztő fagocitózisa szignifikánsan fokozódik (16. ábra). Tehát a mesenchymalis őssejtek jelenléte bizonyos mértékben aktiválja a mikroglia sejteket.

Azonban ahogy azt a citokin termelésben bekövetkező változások is jelzik számunkra (18. ábra), ez az aktiváció lényegesen eltér az endotoxin (LPS) által előidézettektől. LPS hatására a szakirodalomban is leírt [71] klasszikus vagy M1 típusú aktiváció zajlik le, amit a TNF- α termelés arányának megemelkedése jelez számunkra. Ezzel szemben MSC-k jelenlétében az IL-10 termelés fokozódását tapasztaljuk, vagyis a citokin milió gyulladásgátló irányba tolódik el. Irodalmi adatok szerint [72] ez azt jelenti, hogy a mesenchymalis őssejtek M2 típusú vagyis alternatív aktivációt idéznek elő a mikroglia sejteken. Azt is tapasztaltuk továbbá, hogy MSC-k jelenlétében megnő a mikroglia sejtek antigén prezentáló képessége. Ha ezt a tényt összevetjük a 2. táblázatban leírtakkal, arra a következtetésre jutunk, hogy a mesenchymalis őssejtek hatására a regulátor típusú alternatívan aktivált mikroglia sejtek alakulnak ki. Ez a tény terápiás szempontból is kiemelkedő jelentőséggel bír, hiszen az esetleges őssejt-kezelés hatására megjelenő regulátor típusú mikroglia sejtek eredményesek lehetnek a kóros, autoimmun eredetű neurodegeneratív kórképek megfékezésében.

Az MSC-k terápiás célú alkalmazása során azonban az is fontos lenne, hogy a különböző patogénekkal szembeni immunvédekezést ne gátolják, csak a kóros autoimmun folyamatokat, illetve a túlzott mértékű – az egészséges szöveteket is

súlyosan károsító - gyulladást fékezzék meg. A fagocitózist követő citokin termelés vizsgálatakor azt tapasztaltuk, hogy MSC-k jelenlétében a mikroglia sejtek továbbra is fokozott TNF- α termeléssel reagálnak az élesztő fagocitózisra (17. ábra), amit az MSC-k jelenlétének hatására fokozódó IL-10 termelés csak részben képes ellensúlyozni. Ugyanakkor kóros behatástól mentes környezetben, apoptotizáló sejtek fagocitózisát követően egyértelműen a gyulladásgátló hatás érvényesül, MSC-k jelenlétében és a nélkül is (17. ábra). Az imént említettekhez társul az a megfigyelésünk is, hogy ha MSC-eket a bakteriális endotoxinokkal együtt adjuk a mikroglia sejtekhez, akkor a TNF- α dominanciája erősen csökken, bár abszolút mennyisége nem változik, de a felülúszók IL-10 tartalma jelentősen megemelkedik, azaz a TNF- α : IL-10 arány az utóbbi – gyulladás gátló – citokin javára tolódik el. Génexpressziós vizsgálataink tanulsága szerint az LPS M1 irányú aktiváló hatását csak részben blokkolja az őssejtek jelenléte, hiszen MSC-k jelenlétében a TNF- α expressziója közel harmadára lecsökken (21. ábra), de még így is ötszöröse marad a kontrollénak, ami feltehetően elegendő a mérsékeltebb, de még hatékony immunválasz fenntartásához. Ezek az eredményeink látszólag ellent mondanak a más kutatócsoportok által leírtakkal [107], hiszen Zhou és munkatársainak eredményei szerint az MSC-k jelenléte csökkenti az LPS indukálta TNF- α és NO termelést. A jelentős különbséget azzal magyarázhatjuk, hogy az említett munkában a mikroglia sejteket csak előaktiválják LPS-sel, míg mi a két hatást egyidejűleg alkalmazzuk, amit sokkal relevánsabbnak tekintünk. Tehát igazoltuk, hogy az MSC-k jelenléte nem gátolja teljesen, sokkal inkább csak modulálja a klasszikus aktiváció folyamatait, amelyet a patogén(ek)ből származó antigének indítanak el.

A hatás mechanizmusának kutatásakor felvetődő első kérdésünk az volt, hogy a kokultúrákban mely sejtípus termeli a vizsgált mediátorokat. Térbeli szeparációs (17. ábra) és génexpressziós (21. ábra) vizsgálataink eredményei azt mutatják, hogy a sejt-kultúra felülúszókban mérhető TNF- α és IL-10 döntő többségét a mikroglia sejtek termelik, és az MSC-k csak PGE2-t szekretálnak számottevő mennyiségben. Ha összevetjük ezt az eredményt azzal a ténnyel, hogy az IL-10 és a PGE2 mennyisége párhuzamosan változik az MSC-mikroglia kokultúrákban, akkor felvetődik annak lehetőség, hogy az MSC-k által termelt PGE2 egyike lehet azon szolubilis mediátoroknak, amely a mikroglia sejtekre hatva módosítja azok gyulladásgátló citokin termelését. Eredményeink szerint a PGE2 mellett az

inflammaszómák működésének gátlása is jelentős szerepet játszik az MSC-mikroglia kölcsönhatásban.

Következtetések

1. A csontvelő mellett a zsírszövetből, thymusból, lépéből és az aorta falából is sikerült olyan, fibroblast-szerű morfológiát mutató, adherens sejteket izolálnunk, amelyek felszíni markereik, valamint adipocytá és osteoblast irányú differenciálódási képességük alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők.
2. Ezek az MSC-k – a thymusból származó sejtek kivételével – gátolják a T limfociták mitogén és alloantigén-indukált osztódását *in vitro* kultúrában, vagyis hasonló immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek.
3. A csontvelői és zsírszövet eredetű MSC-k aktivált T sejtek vagy gyulladásoos citokinek jelenlétében nagy mennyiségű prosztaglandin E2 termelésére képesek, ami potenciális immunszuppresszív mediátornak tekinthető.
4. A legfontosabb gyulladásoos citokinek – TNF- α és IFN- γ - egymás hatását erősítve fokozzák a mesenchymalis őssejtek PGE2 termelését.
5. Az MSC-k PGE2 termelését nem egy kitüntetett mediátor vagy nem-redundáns molekuláris mechanizmus szabályozza, sokkal inkább több jelátviteli rendszer együttesen játszik benne szerepet.
6. Mesenchymalis őssejtek adásával eredményesen kezelhető a kísérletes autoimmun encephalomyelitis.
7. MSC-k jelenlétében a mikroglia sejtek morfológiája, élesztő fagocitózis intenzitása, citokin termelése illetve antigén prezentáló képessége jelentősen módosul. Ebből arra következtethetünk, hogy a mesenchymalis őssejtek M2 típusú vagyis alternatív aktivációt idéznek elő a mikroglia sejteken.
8. MSC-k jelenléte nem gátolja teljesen, sokkal inkább csak modulálja a klasszikus aktiváció folyamatait, amelyet a patogén(ek)ből származó antigének (mint pl. gombasejtek, endotoxinok) indítanak el.
9. Az MSC-k által termelt PGE2 lehet az egyik fontos szolubilis mediátor, amely a mikroglia sejtekre hatva módosítja azok gyulladásoos és gyulladásgátló citokin termelését. Az inflammaszómák működésének gátlása is jelentős szerepet játszik az MSC-mikroglia kölcsönhatásban.

Összefoglalás

A mesenchymalis ősz- vagy stroma sejtek (röviden MSC-k) olyan nem-haematopoietikus szöveti őssejtek, amelyek fontos szerepet játszanak többféle szövet önfenntartásában és regenerációjában, valamint – erőteljes immunzsuppresszív képességüknel fogva – a szervezet védekező rendszerének szabályozásában is. Az MSC-k a gyulladásos citokinek termelésének gátlása mellett elősegítik a károsodott sejtek túlélését is, éppen ezért különösen alkalmasak autoimmun betegségek kezelésére, noha a terápiás hatás molekuláris mechanizmusai máig nem ismertek pontosan.

A disszertációban bemutatott eredmények tanulsága szerint egerek több különféle szervéből/szövetéből (csontvelőből, zsírszövetből, thymusból, lépből és az aorta falából is) izolálhatunk MSC-eket, amelyek eredetük függvényében eltérő mértékű immunzsuppresszív aktivitással rendelkeznek. A különböző MSC populációk azonban – a thymus eredetű sejtek kivételével – egyaránt képesek gátolni a mitogén és alloantigén indukált T sejt proliferációt *in vitro* kultúrában. A csontvelői MSC-k *in vivo* terápiás körülmények között is kifejtik immunzsuppresszív aktivitásukat, ugyanis kísérletes autoimmun encephalomyelitisben (EAE-ben) az őssejt-terápián átesett egerek szignifikánsan gyorsabb állapot-javulást mutattak.

Az MSC-k képesek befolyásolni az EAE indukciójában és progressziójában is kulcsszerepet játszó mikroglia sejtek aktivációját *in vitro*: jelenlétükben a mikroglia sejtek morfológiai változáson mennek keresztül, továbbá élesztő fagocitózisuk intenzitása, citokin termelésük és antigén prezentáló képességük is jelentősen megváltozik. Ez arra enged következtetni, hogy az MSC-k M2-típusú, alternatív aktivációt idéznek elő a mikroglia sejteken. Az őssejtek jelenléte azonban nem gátolja teljesen, csak modulálja a klasszikus aktiváció folyamatait, amelyet a patogén(ek)ből származó antigének indítanak el. Az MSC-k mikroglia sejtekre gyakorolt hatásában a PGE2 kulcsszerepet tölt be, amely potenciális immunzsuppresszív mediátornak tekinthető. Az MSC-k gyulladásos citokinek valamint aktivált T sejtek jelenlétében nagy mennyiségű PGE2-t termelnek, amit nem egy kitüntetett mediátor, sokkal inkább több jelátviteli rendszer együttese szabályoz.

Ezek az eredmények jelentősen hozzájárulhatnak az MSC-alapú őssejt-terápiás eljárások kidolgozásához.

Abstract

Bone marrow mesenchymal stem or stromal cells (MSCs) are non-hematopoietic stem/progenitor cells involved in the maintenance and repair of tissues, and regulation of effector immune-cell functions via their powerful immunosuppressive activity. MSCs can inhibit the release of pro-inflammatory cytokines meanwhile they promote the survival of the damaged cells. This capability made them attractive candidates for the treatment of autoimmune disorders, but the exact mechanism of the therapeutic action remained unclear.

In our study we could demonstrate that mouse MSCs can be isolated from various tissues, such as bone marrow, fat, thymus, spleen and aorta, however, the anatomic localization of the MSCs influences their immunosuppressive activity. We show that the characterized MSC populations inhibit the proliferation of mitogen and alloantigen-induced T lymphocytes *in vitro*, except the thymus-derived MSCs.

Bone marrow MSCs exert immunosuppressive activity *in vivo*, since mice underwent stem cell therapy showed significantly faster improvement in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). MSCs are also able to influence the activation of microglial cells, which play a key role in the induction and progression of EAE, *in vitro*.

In the presence of MSCs microglial cells underwent morphological alteration while the intensity of yeast phagocytosis, the IL-10 production and the antigen-presenting capacity significantly increased. These results suggest that mesenchymal stem cells induce alternative, M2-like activation of microglial cells. MSCs, however, does not prevent entirely, but only modulate the process of classical activation induced by the pathogen(s) derived antigens (such as LPS). PGE2 produced by MSCs can be one of the key soluble mediators, which acts on microglial cells and influence their activation.

MSC produce high amount of PGE2, a potentially immunosuppressive mediator in response to pro-inflammatory cytokines (TNF- α and IFN- γ) or in the presence of activated T-cells. The regulation of the PGE2 secretion by MSCs, however, is not mediated by a single or unique signal pathway, more likely several redundant molecular mechanism contribute in the fine-tuning of the cytokine secretion.

These findings have important implications with respect to the improvement of MSC-based therapeutic strategies.

Irodalomjegyzék

1. Eckfeldt, C.E., Mendenhall, E.M., Flynn, C.M., Wang, T.F., Pickart, M.A., Grindle, S.M., Ekker, S.C., and Verfaillie, C.M. (2005). Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS Biol* 3, e254.
2. Slack, J.M. (2008). Origin of stem cells in organogenesis. *Science* 322, 1498-1501.
3. Uccelli, A., Moretta, L., and Pistoia, V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 8, 726-736.
4. Friedenstein, A., Chailakhjan, R., and Lalykina, K. (1970). The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet* 3, 393-403.
5. Pittenger, M.F., Mackay, A.M., Beck, S.C., Jaiswal, R.K., Douglas, R., Mosca, J.D., Moorman, M.A., Simonetti, D.W., Craig, S., and Marshak, D.R. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284, 143-147.
6. Beltrami, A.P., Cesselli, D., Bergamin, N., Marcon, P., Rigo, S., Puppato, E., D'Aurizio, F., Verardo, R., Piazza, S., Pignatelli, A., et al. (2007). Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood* 110, 3438-3446.
7. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P.C., and Nardi, N.B. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci* 119, 2204-2213.
8. Zuk, P.A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J.W., Katz, A.J., Benhaim, P., Lorenz, H.P., and Hedrick, M.H. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng* 7, 211-228.
9. Erices, A., Conget, P., and Minguell, J.J. (2000). Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol* 109, 235-242.
10. Baksh, D., Song, L., and Tuan, R.S. (2004). Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *Journal of Cellular and Molecular Medicine* 8, 301-316.

11. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F.C., Krause, D.S., Deans, R.J., Keating, A., Prockop, D.J., and Horwitz, E.M. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
12. Colter, D.C., Sekiya, I., and Prockop, D.J. (2001). Identification of a subpopulation of rapidly self-renewing and multipotential adult stem cells in colonies of human marrow stromal cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 7841-7845.
13. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007). Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells* 25, 2739-2749.
14. Ankrum, J., and Karp, J. (2010). Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*.
15. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., et al. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol* 30, 42-48.
16. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringdén, O. (2003). HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp Hematol* 31, 890-896.
17. Romieu-Mourez, R., François, M., Boivin, M.N., Stagg, J., and Galipeau, J. (2007). Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-gamma, TGF-beta, and cell density. *J Immunol* 179, 1549-1558.
18. Chan, J.L., Tang, K.C., Patel, A.P., Bonilla, L.M., Pierobon, N., Ponzio, N.M., and Rameshwar, P. (2006). Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood* 107, 4817-4824.
19. Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., et al. (2010). Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res* 20, 510-518.

20. Bunnell, B.A., Betancourt, A.M., and Sullivan, D.E. (2010). New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther* 1, 34.
21. Bassi, E.J., Aita, C.A., and Câmara, N.O. (2011). Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J Stem Cells* 3, 1-8.
22. Bassi, Ê., Moraes-Vieira, P.M., Moreira-Sá, C.S., Almeida, D.C., Vieira, L.M., Cunha, C.S., Hiyane, M.I., Basso, A.S., Pacheco-Silva, A., and Câmara, N.O. (2012). Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. *Diabetes* 61, 2534-2545.
23. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P.D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A.M. (2002). Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* 99, 3838-3843.
24. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S.E., and Ringdén, O. (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.
25. Djouad, F., Poncelet, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., and Jorgensen, C. (2003). Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood* 102, 3837-3844.
26. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P.J., Lam, E.W., and Dazzi, F. (2005). Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood* 105, 2821-2827.
27. Groh, M.E., Maitra, B., Szekely, E., and Koç, O.N. (2005). Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells. *Exp Hematol* 33, 928-934.
28. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., et al. (2006). Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells* 24, 386-398.

29. Di Ianni, M., Del Papa, B., De Ioanni, M., Moretti, L., Bonifacio, E., Cecchini, D., Sportoletti, P., Falzetti, F., and Tabilio, A. (2008). Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol* 36, 309-318.
30. Zhang, W., Ge, W., Li, C., You, S., Liao, L., Han, Q., Deng, W., and Zhao, R.C. (2004). Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* 13, 263-271.
31. Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105, 2214-2219.
32. Jiang, X.X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.X., Wu, Y., Yu, X.D., and Mao, N. (2005). Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 105, 4120-4126.
33. Aggarwal, S., and Pittenger, M.F. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105, 1815-1822.
34. Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2003). Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation* 76, 1208-1213.
35. Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Becchetti, S., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2006). Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood* 107, 1484-1490.
36. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., Pistoia, V., et al. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-372.
37. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringdén, O. (2007). Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand J Immunol* 65, 336-343.
38. Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I.M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Cañones, C., Raiden, S., Vermeulen, M., et al.

- (2010). Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One* 5, e9252.
39. Le Blanc, K., Rasmusson, I., Sundberg, B., Götherström, C., Hassan, M., Uzunel, M., and Ringdén, O. (2004). Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet* 363, 1439-1441.
 40. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., et al. (2005). Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* 106, 1755-1761.
 41. Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R., et al. (2007). Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of Neurology* 61, 219-227.
 42. Madec, A.M., Mallone, R., Afonso, G., Abou Mrad, E., Mesnier, A., Eljaafari, A., and Thivolet, C. (2009). Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia* 52, 1391-1399.
 43. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2007). Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum* 56, 1175-1186.
 44. Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P., Leelahavanichkul, K., Koller, B., Brown, J., et al. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med* 15, 42-49.
 45. Gonzalez-Rey, E., Anderson, P., González, M.A., Rico, L., Büscher, D., and Delgado, M. (2009). Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut* 58, 929-939.
 46. Rojas, M., Xu, J., Woods, C.R., Mora, A.L., Spears, W., Roman, J., and Brigham, K.L. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol* 33, 145-152.

47. Rasmusson, I. (2006). Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp Cell Res* 312, 2169-2179.
48. Ryan, J.M., Barry, F., Murphy, J.M., and Mahon, B.P. (2007). Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol* 149, 353-363.
49. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol* 35, 1482-1490.
50. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141-150.
51. Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *J Clin Invest* 122, 1180-1188.
52. Simmons, S.B., Pierson, E.R., Lee, S.Y., and Goverman, J.M. (2013). Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals. *Trends Immunol* 34, 410-422.
53. Oksenberg, J.R., and Baranzini, S.E. (2010). Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nat Rev Neurol* 6, 429-437.
54. Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1, 1952-1960.
55. Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006). Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1, 1810-1819.
56. Morando, S., Vigo, T., Esposito, M., Casazza, S., Novi, G., Principato, M.C., Furlan, R., and Uccelli, A. (2012). The therapeutic effect of mesenchymal stem cell transplantation in experimental autoimmune encephalomyelitis is mediated by peripheral and central mechanisms. *Stem Cell Res Ther* 3, 3.
57. O'Connor, R.A., and Anderton, S.M. (2008). Foxp3+ regulatory T cells in the control of experimental CNS autoimmune disease. *J Neuroimmunol* 193, 1-11.
58. Rawji, K.S., and Yong, V.W. (2013). The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin Dev Immunol* 2013, 948976.

59. Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253-262.
60. Lynch, M.A. (2009). The multifaceted profile of activated microglia. *Mol Neurobiol* 40, 139-156.
61. Fedoroff, S., Zhai, R., and Novak, J.P. (1997). Microglia and astroglia have a common progenitor cell. *J Neurosci Res* 50, 477-486.
62. McKercher, S.R., Torbett, B.E., Anderson, K.L., Henkel, G.W., Vestal, D.J., Baribault, H., Klemsz, M., Feeney, A.J., Wu, G.E., Paige, C.J., et al. (1996). Targeted disruption of the PU.1 gene results in multiple hematopoietic abnormalities. *EMBO J* 15, 5647-5658.
63. Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* 330, 841-845.
64. Boche, D., Perry, V.H., and Nicoll, J.A. (2013). Review: Activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathol Appl Neurobiol* 39, 3-18.
65. Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752-758.
66. Nimmerjahn, A., Kirchhoff, F., and Helmchen, F. (2005). Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308, 1314-1318.
67. Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.
68. Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.
69. Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J Exp Med* 176, 287-292.
70. Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol* 8, 958-969.

71. Herber, D.L., Maloney, J.L., Roth, L.M., Freeman, M.J., Morgan, D., and Gordon, M.N. (2006). Diverse microglial responses after intrahippocampal administration of lipopolysaccharide. *Glia* 53, 382-391.
72. Schwartz, M., Butovsky, O., Brück, W., and Hanisch, U.K. (2006). Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29, 68-74.
73. Peister, A., Mellad, J.A., Larson, B.L., Hall, B.M., Gibson, L.F., and Prockop, D.J. (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.
74. Urbán, V.S., Kiss, J., Kovács, J., Gócza, E., Vas, V., Monostori, E., and Uher, F. (2008). Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells* 26, 244-253.
75. Saura, J., Tusell, J.M., and Serratos, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44, 183-189.
76. Környei, Z., Gócza, E., Rühl, R., Orsolits, B., Vörös, E., Szabó, B., Vágovits, B., and Madarász, E. (2007). Astroglia-derived retinoic acid is a key factor in glia-induced neurogenesis. *FASEB J* 21, 2496-2509.
77. Meirelles, L.a.S., and Nardi, N.B. (2003). Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vitro expansion, and characterization. *Br J Haematol* 123, 702-711.
78. Hegyi, B., Sági, B., Kovács, J., Kiss, J., Urbán, V.S., Mészáros, G., Monostori, E., and 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.
79. Gebler, A., Zabel, O., and Seliger, B. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med* 18, 128-134.
80. Ben-Ami, E., Berrih-Aknin, S., and Miller, A. (2011). Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev* 10, 410-415.
81. De Miguel, M.P., Fuentes-Julián, S., Blázquez-Martínez, A., Pascual, C.Y., Aller, M.A., Arias, J., and Arnalich-Montiel, F. (2012). Immunosuppressive

- properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med* 12, 574-591.
82. Keating, A. (2012). Mesenchymal stromal cells: new directions. *Cell Stem Cell* 10, 709-716.
 83. Ren, G., Chen, X., Dong, F., Li, W., Ren, X., Zhang, Y., and Shi, Y. (2012). Concise review: mesenchymal stem cells and translational medicine: emerging issues. *Stem Cells Transl Med* 1, 51-58.
 84. Benveniste, E.N. (1997). Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med (Berl)* 75, 165-173.
 85. Sági, B., Maraghechi, P., Urbán, V.S., Hegyi, B., Szigeti, A., Fajka-Boja, R., Kudlik, G., Németh, K., Monostori, E., Gócsa, E., et al. (2012). Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev* 21, 814-828.
 86. Revest, J.M., Suniara, R.K., Kerr, K., Owen, J.J., and Dickson, C. (2001). Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol* 167, 1954-1961.
 87. Meijlink, F., Beverdam, A., Brouwer, A., Oosterveen, T.C., and Berge, D.T. (1999). Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol* 43, 651-663.
 88. Roberts, C.W., Shutter, J.R., and Korsmeyer, S.J. (1994). Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature* 368, 747-749.
 89. Leucht, P., Kim, J.B., Amasha, R., James, A.W., Girod, S., and Helms, J.A. (2008). Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development* 135, 2845-2854.
 90. Esaki, Y., Li, Y., Sakata, D., Yao, C., Segi-Nishida, E., Matsuoka, T., Fukuda, K., and Narumiya, S. (2010). Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 12233-12238.
 91. Yang, S.H., Park, M.J., Yoon, I.H., Kim, S.Y., Hong, S.H., Shin, J.Y., Nam, H.Y., Kim, Y.H., Kim, B., and Park, C.G. (2009). Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med* 41, 315-324.

92. Chen, K., Wang, D., Du, W., Han, Z., Ren, H., Chi, Y., Yang, S., Zhu, D., Bayard, F., and Han, Z. (2010). Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE(2)-dependent mechanism. *Clin Immunol*.
93. Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., et al. (2008). A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research* 18, 846-857.
94. Xue, Q., Luan, X.Y., Gu, Y.Z., Wu, H.Y., Zhang, G.B., Yu, G.H., Zhu, H.T., Wang, M., Dong, W., Geng, Y.J., et al. (2010). The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity. *Stem Cells Dev* 19, 27-38.
95. Murakami, M., and Kudo, I. (2004). Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* 43, 3-35.
96. Duffy, M.M., Pindjakova, J., Hanley, S.A., McCarthy, C., Weidhofer, G.A., Sweeney, E.M., English, K., Shaw, G., Murphy, J.M., Barry, F.P., et al. (2011). Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol*.
97. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
98. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A.I., Zhao, R.C., and Shi, Y. (2008). Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell* 2, 141-150.
99. Croitoru-Lamoury, J., Guillemin, G.J., Boussin, F.D., Mognetti, B., Gigout, L.I., Chéret, A., Vaslin, B., Le Grand, R., Brew, B.J., and Dormont, D. (2003). Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia* 41, 354-370.

100. Clarke, D.L., Clifford, R.L., Jindarat, S., Proud, D., Pang, L., Belvisi, M., and Knox, A.J. (2010). TNF α and IFN γ synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF- κ B, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem* 285, 29101-29110.
101. Lee, S.J., Park, J.Y., Hou, J., and Benveniste, E.N. (1999). Transcriptional regulation of the intercellular adhesion molecule-1 gene by proinflammatory cytokines in human astrocytes. *Glia* 25, 21-32.
102. Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A., Le, A., Shi, S., Shao, C., et al. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol* 184, 2321-2328.
103. McQualter, J.L., and Bernard, C.C. (2007). Multiple sclerosis: a battle between destruction and repair. *J Neurochem* 100, 295-306.
104. Jack, C., Ruffini, F., Bar-Or, A., and Antel, J.P. (2005). Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res* 81, 363-373.
105. Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119-145.
106. Saijo, K., and Glass, C.K. (2011). Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nat Rev Immunol* 11, 775-787.
107. Zhou, C., Zhang, C., Chi, S., Xu, Y., Teng, J., Wang, H., Song, Y., and Zhao, R. (2009). Effects of human marrow stromal cells on activation of microglial cells and production of inflammatory factors induced by lipopolysaccharide. *Brain Res* 1269, 23-30.

Saját publikációk jegyzéke

A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

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*. *Int Immunol* 22:551-559. (2010) (IF=3,301)

Bernadett Sági, Pouneh 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=4,459)

Beáta Hegyi, Gyöngyi Kudlik, Éva Monostori and Ferenc Uher: *Activated T-cells and Pro-Inflammatory Cytokines Differentially Regulate Prostaglandin E2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells*. *Biochem Biophys Res Commun* 419:215-220. (2012) (IF=2,484)

Hegyi Beáta, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladáso- és immun-folyamatok szabályozásában*. *Immunológiai Szemle* 4:(2), 4-10 (2012)

Beáta Hegyi, Zsuzsanna Környei, Szilamér Ferenczi, Rebeka Fekete, Gyöngyi Kudlik, Éva Monostori, Krisztina Kovács, Emília Madarász, and Ferenc Uher: *Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells* (manuscript under revision) (2014)

A disszertációtól független közlemények:

Gábor János Szebeni, Éva Kriston-Pál, Péter Blazsó, Róbert László Katona, Julianna Novák, Enikő Szabó, Ágnes Czibula, Roberta Fajka-Boja, **Beáta Hegyi**, Ferenc Uher, László Krenács, Gabriella Joó, Éva Monostori *Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion*. PLoS One.;7(7):e41372 (2012) (IF= 4.092)

Urbán S Veronika, **Hegyi Beáta**, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: *A diabetes mellitus őssejtterápiája - Az endocrin pancreas regenerációja*. Diabetologia Hungarica, 19:(4), 279-286. (2011)

Urbán S Veronika, Benevolenskaya Elizaveta, Kiss Judit, Sági Bernadett, **Hegyi Beáta**, Uher Ferenc: *A genetikan is túl - Az epigenetika előretörése és orvosi vonatkozásai. [Beyond genetics - The emerging role of epigenetics and its clinical aspects]*. Orvosi Hetilap 153:(6), 214-221. (2012)

Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, **Dr. Uher Ferenc** professzor úrnak kell megköszönnöm, hogy egyetemi hallgatóként szakdolgozóvá fogadott, bevezetett az őssejtbiológiai kutatások rejtelmeibe és tanácsaival azóta is segített munkámat. A gyakran felmerülő nehézségekkel szembeni állhatatos küzdelme, beosztottjaiért való felelősségvállalása és embersége jó példával szolgál számomra az élet minden területén.

Köszönöm **Kiss Judit** és **Suhajdné Urbán Veronika** korábbi PhD hallgatóknak, hogy a mindennapi munka során szerzett tapasztalataikat megosztották velem. Köszönet illeti **Ullrich Olga** asszisztensnőnkét és **Szotár Gabriella** állatgondozónkat is, akik teendőik precíz elvégzésével járultak hozzá laborunk működéséhez.

Munkám eredményessége természetesen nagyban függ az együttműködésben velünk dolgozó kollégáktól és barátoktól is. Ezért köszönet illeti meg **Monostori Évát** (MTA, SZBK, Genetikai Intézet), **Német Katalint** (OVSZ, Générápiás Laboratórium), **Madarász Emiliát** és **Környei Zsuzsannát** (MTA-KOKI Idegi Sejt- és Fejlődésbiológia Kutatócsoport), valamint **Kovács Krisztinát** és **Ferenczi Szilamért** (MTA-KOKI, Molekuláris Neuroendokrinológia Kutatócsoport) is.

Köszönöm a családomnak, hogy támogatásukkal és munkájukkal lehetővé tették ennek a nagy útnak a megtételét. Vőlegényemnek, Gál Barnának pedig hűségéért, mindennapi jelenléteért és végtelen türelméért jár hála és köszönet.