

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

Doktori értekezés

Matula Zsolt

Semmelweis Egyetem
Patológiai tudományok Doktori Iskola



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

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

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

Budapest
2017

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	7
1.1 A mezenchimális őssejtek jellemzése, szöveti forrásai	7
1.2 A mezenchimális őssejtek immunológiai sajátosságai	9
1.3 A mezenchimális őssejtek terápiás alkalmazásának lehetőségei	10
1.4 Mezenchimális őssejtek immortalizálása.....	11
1.5 Az extracelluláris vezikulák csoportosítása, jellemzői	12
1.6 A mezenchimális őssejt eredetű extracelluláris vezikulák jellemzői, immunszuppresszív aktivitása	14
1.7 Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák T limfocitákra gyakorolt gátló hatása	16
2. Célkitűzések	18
3. Módszerek	20
3.1 Sejtek izolálása és tenyésztése	20
3.2 Mikrovezikulák és exoszómák izolálása sejt kultúra felülúszókból	21
3.3 Dinamikus fényszórás mérés (Dynamic light scattering analysis, DLS).....	21
3.4 Izon qNano technológián alapuló részecskeméret -és koncentráció meghatározás	22
3.5 Transmissziós elektronmikroszkópia (TEM).....	22
3.6 A sejtek és extracelluláris vezikulák áramlási citometriás vizsgálata	23
3.7 A sejtek és extracelluláris vezikulák jelölése fluoreszcens festékekkel –	24
ko-kultúra modellek.....	24
3.8 Konfokális lézer scanning mikroszkópia	25
3.9 A mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű extracelluláris vezikulák és az MSC- kondicionált médium immunszuppresszív hatása az in vitro stimulált T limfocitákra és Jurkat sejtekre.....	26
3.10 Intracelluláris interferon-gamma (IFN- γ) immunesszé.....	27
3.11 Karboxifluorescein szukcinimidil észter (CFSE) sejtproliferációs-esszé ..	27
3.12 Prostaglandin E ₂ immunesszé.....	28
3.13 Lentivirális génbevitel.....	28
3.14 Kvantitatív valós idejű PCR (RT-qPCR) reakció provírus kópiaszám meghatározásához.....	28
3.15 Génexpressziós vizsgálatok.....	29
3.16 Immuncitokémia.....	30
3.17 Telomeráz aktivitás meghatározása	30

3.18	A mezenchimális őssejtek csont és zsír irányú differenciációs képességének vizsgálata	30
3.19	A sejtek szenescenciájának kimutatása β -galaktozidáz festéssel	31
3.20	Kariotípus meghatározása	31
3.21	In vivo tumorképzés vizsgálat.....	32
3.22	Sejtciklus vizsgálat.....	32
3.23	A provirus integrációs helyének pontos meghatározása – ligáció-mediált PCR (LM-PCR).....	32
3.24	Statisztikai analízis.....	33
4.	Eredmények	34
4.1	A primer mezenchimális őssejtek sejtfelszíni markerei és differenciálódási képessége	34
4.2	Az extracelluláris vezikulák, szolubilis mediátorok és közvetlen sejtkapcsolatok szerepe a primer mezenchimális őssejtek és perifériás T limfociták, Jurkat limfóma sejtek és egér timociták közötti kommunikációban	36
4.2.1	Extracelluláris vezikulák, mikrovezikulák és exoszómák izolálása és karakterizálása	37
4.2.2	Membrán vezikulák és citoplazmatikus eredetű anyagok átadásának vizsgálata a mezenchimális őssejtekből egér timociták, humán perifériás T limfociták és Jurkat sejtek irányába.....	41
4.2.3	Membrán vezikulák és citoplazmatikus eredetű anyagok átadásának vizsgálata egér timocitákból, humán perifériás T limfocitákból és Jurkat sejtekből a mezenchimális őssejtek irányába.....	43
4.2.4	Membrán nanocsövek vizsgálata zsír eredetű mezenchimális őssejtek és humán perifériás T limfociták között	50
4.2.5	A mezenchimális őssejt-eredetű mikrovezikulák és exoszómák, parakrin faktorok valamint közvetlen sejt-sejt kapcsolatok immunszuppresszív hatása in vitro stimulált T limfociták esetében.....	53
4.2.6	A mezenchimális őssejt-eredetű mikrovezikulák és exoszómák, parakrin faktorok valamint közvetlen sejt-sejt kapcsolatok sejtosztódást gátló hatása Jurkat limfóma sejtek esetében.....	61
4.2.7	A T limfocita-eredetű mikrovezikulák és exoszómák gátló hatása a mezenchimális őssejtek prostaglandin E ₂ termelésére.....	62
4.3	Immortalizált mezenchimális őssejtvonalak vizsgálata	64
4.3.1	Immortalizált sejtvonalak létrehozása	64
4.3.2	Az immortalizáló gének expressziós szintjének meghatározása	64
4.3.3	Provirus kópiaszámának meghatározása	67
4.3.4	Proliferációs -és sejtöregedés vizsgálatok	68
4.3.5	Sejtfelszíni antigének és differenciációs képesség vizsgálata	69
4.3.6	Kariotípus meghatározása és a tumorképző képesség vizsgálata.....	71

4.3.7	A Zs- MSC^{hTERT} sejtvonallal lehetséges transzformációja magas passzázs- szám mellett.....	72
5.	Megbeszélések	75
6.	Következtetések	84
7.	Összefoglalás	86
8.	Summary	87
9.	Irodalomjegyzék	88
10.	Saját közlemények jegyzéke	104
10.1	A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:.....	104
10.2	A disszertációtól független közlemények:	104
11.	Köszönetnyilvánítás.....	106

Rövidítések jegyzéke

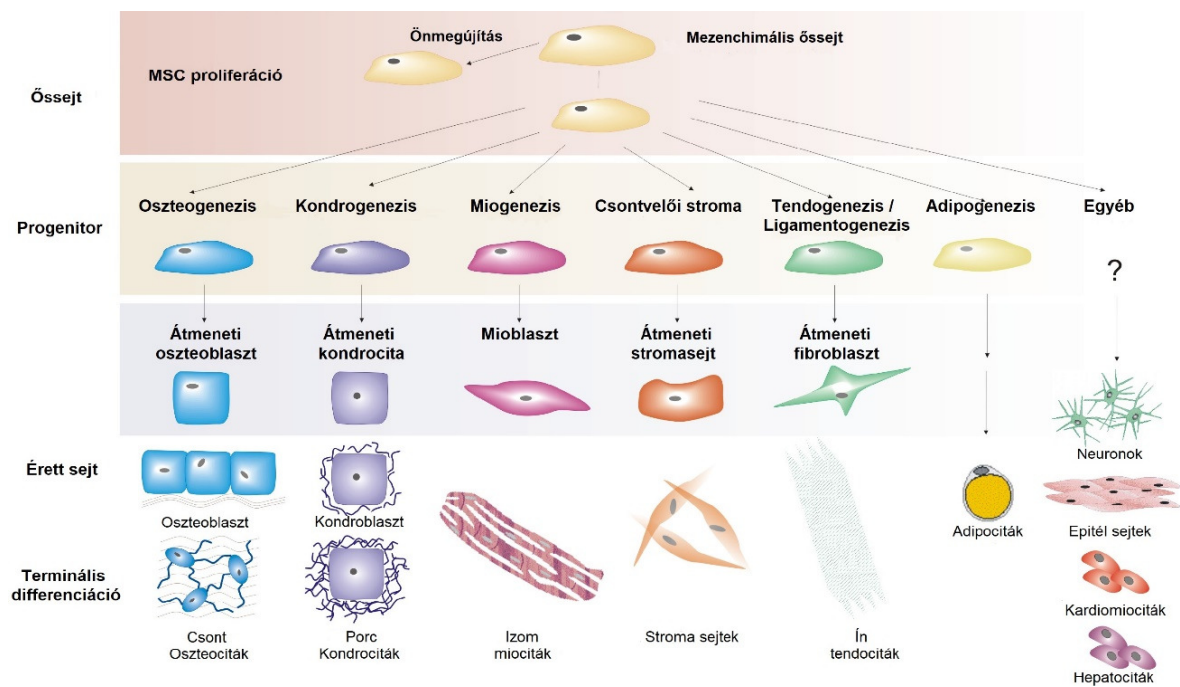
AB	apoptotikus test (apoptotic body)
ALP	alkalikus foszfatáz (alkaline phosphatase)
APC	antigén-prezentáló sejt (antigen-presenting cell)
BSA	szarvasmarha szérum albumin (bovine serum albumin)
CCR	kemokin receptor (chemokine receptor)
cDNS	RNS-ről átírt DNS (copy DNA)
CFSE	karboxifluorescein szukcinimidil észter (carboxyfluorescein succinimidyl ester)
ConA	concanavalin A
DLS	dinamikus fényszórás mérés (dynamic light scattering)
DMEM/F12	Dulbecco által módosított Eagle-médium és Ham féle F12 tápláló oldat keveréke (Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12)
EV	extracelluláris vezikula (extracellular vesicle)
EXO	exoszóma (exosome)
FBS	magzati borjúsavó (fetal bovine serum)
FGF	fibroblaszt növekedési faktor (fibroblast growth factor)
GVHD	graft-versus-host betegség (graft-versus-host disease)
HGF	hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor)
HLA	humán leukocita antigén (human leukocyte antigens)
hTERT	humán telomeráz reverz transzkriptáz (human telomerase reverse transcriptase)
IDO	indolamin-2,3-dioxigenáz enzim
IFN- γ	gamma interferon
IGF-1	inzulinszerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor 1)
iPS	indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)
IL-10	interleukin-10
LM-PCR	ligáció-mediált polimeráz láncreakció
LV	lentivírus
MCP	monocita kemotaktikus fehérje 1 (monocyte chemoattractant protein 1)
MDR1	multidrog rezisztencia protein 1 (multidrug resistance protein 1)

mRNS	hírvivő RNS (messenger RNA)
MRP1	multidrog rezisztencia-asszociált protein 1 (multidrug resistance-associated protein 1)
miRNS	mikro-RNS
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
MMP	mátrix metalloproteináz (matrix metalloproteinase)
MSC	mezenchimális ősz- vagy stromasejt (mesenchymal stem/stromal cell)
MSC-KM	mezenchimális őssejt-kondicionált médium
MV	mikrovezikula (microvesicle)
PBMC	perifériás vér mononukleáris sejt (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	foszfát-pufferolt fiziológiai sóoldat (phosphate-buffered saline)
PFA	paraformaldehid
PDGF	vérlemezke-eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)
PDT	populáció kettőződés időtartama (population duplication time)
PIGF	placenta-eredetű növekedési faktor (placenta-derived growth factor)
PGE ₂	prostaglandin E ₂
qPCR	kvantitatív polimeráz láncreakció (quantitative polymerase chain reaction)
RT-qPCR	valós idejű kvantitatív polimeráz láncreakció (real-time quantitative polymerase chain reaction)
RUNX-2	runt-függő transzkripció faktor 2 (runt-related transcription factor 2)
SA-β-Gal	szeneszencia-asszociált β-galaktozidáz
SDF-1	stroma-eredetű faktor 1 (stromal-derived factor 1)
TEM	transzmissziós elektronmikroszkópia
TGF-β	transzformáló növekedési faktor β (transforming growth factor β)
TNF-α	tumornekrózis-faktor α
TRPS	Izon qNano technológia (tunable resistive pulse sensing)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
Zs-MSC	zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejt

1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1 A mezenchimális őssejtek jellemzése, szöveti forrásai

A mezenchimális őssejtek olyan szöveti eredetű ős- vagy elődsejtek, melyek már részben elköteleződtek valamilyen szövettípusra jellemző fejlődési irányba, tehát csak bizonyos sejtípusok létrehozására képesek. Természetesen asszimmetrikus osztódással önmegújításra is képesek, tehát a meghatározott funkcióra specializált utódsejt létrehozásán kívül képesek egy differenciálatlan, még egyértelműen őssejtnek tekinthető utódsejt létrehozására is. A pluripotens őssejtekkel ellentétben – amelyek az extraembrionális szövetek kivételével a felnőtt szervezetre jellemző valamennyi szövet- és sejtípus létrehozására képesek – a mezenchimális őssejtek differenciációs képessége már korlátozott, ezért is szokták ezt a sejtfeleséget multipotensnek nevezni.



1. ábra: A mezenchimális őssejtek differenciálódási képessége

Forrás: Caplan AI, Bruder SP: *Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century*. Trends in Molecular Medicine; 7(6):259-64 (2001)

A pluripotens őssejtek – embrionális őssejtek és indukált pluripotens őssejtek (iPS sejtek) – differenciációjuk során még képesek mind az ektodermális, mezodermális és endodermális eredetű sejttypusok létrehozására. A mezenchimális őssejtek ezzel ellentétben elsősorban a mezodermális eredetű szövetekre jellemző sejttypusok létrehozására alkalmasak, tehát csont, porc, zsírszövet, simaizom, inak létrehozására képesek differenciációjuk során (**1. ábra**). Egyes források szerint speciális tenyésztési körülmények között képesek ectodermális és endodermális irányú differenciációra is, bár ezen képességük, amelyet unortodox plaszticitásnak is szokás nevezni, erősen vitatott [1].

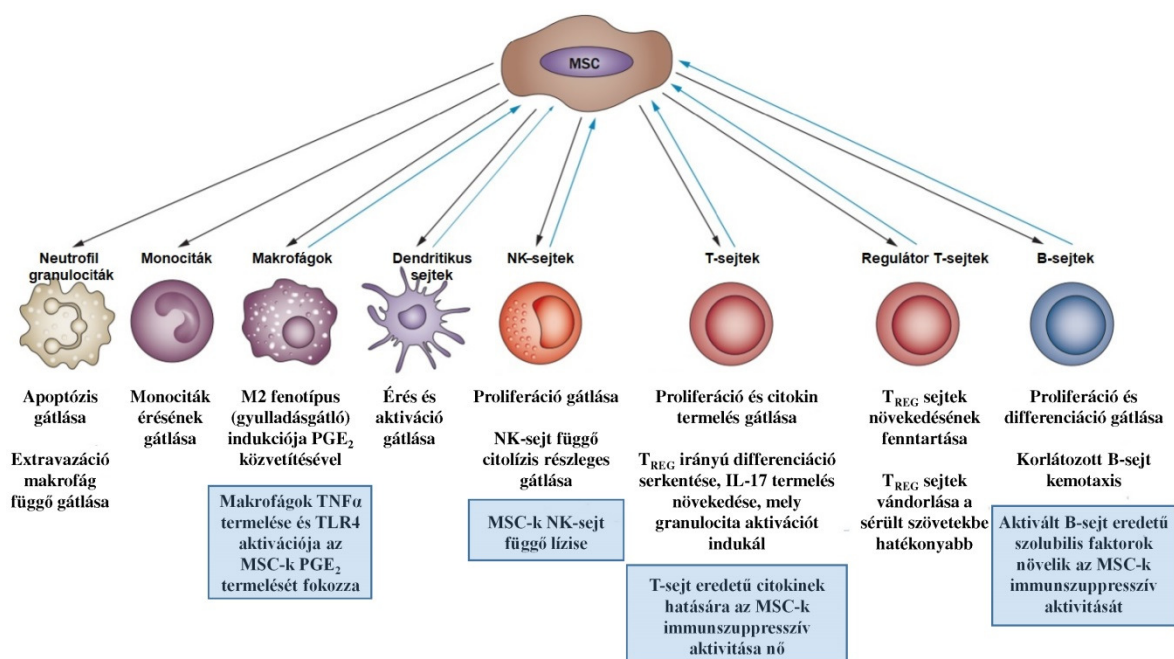
A mezenchimális őssejteket eredetileg a csontvelő stróma állományában azonosították, mint *in vitro* kultúrában a tenyésztőedény aljához kitapadó, fibroblaszt-szerű morfológiát mutató, kolóniaképző sejtpopulációt. A csontvelői stróma állományban ezek a sejtek az endotél sejtekkel együttműködve biztosítják a megfelelő mikrokörnyezetet a vérképző őssejtek számára, mely a normálisan működő felnőtt vérképzés szempontjából elengedhetetlen [2]. Manapság már széles körűen elfogadottá vált az a nézet, miszerint a mezenchimális őssejtek szinte valamennyi szervből és szövetből izolálható kötőszöveti őssejteknek tekinthetők [3]. A csontvelőn kívül nagyon könnyen hozzáférhető forrásuk a zsírszövet, a köldökzsínór ún. Wharton-kocsonyája, de mindemellett a timuszból, májból, tüdőből, veséből, lépből, izomszövetből, és még számos egyéb szövetből is – aortából vagy vena cava falából, sőt egyes források szerint agyszövetből is – éppúgy kinyerhetőek [4,5].

A mezenchimális ős-, vagy más megjelölés szerint mezenchimális strómasejtek izolálása még a mai napig plasztik adherenciájukon alapszik, mivel speciális, csak rájuk jellemző markerekkel nem rendelkeznek. Az International Society for Cellular Therapy (ISCT) javasolta még 2006-ban azokat a minimális kritériumokat, melyek teljesülése esetén az adott sejteket mezenchimális őssejteknek tekinthetjük. Ez a kritériumrendszer a mai napig érvényben van: azok a sejtek tekinthetjük mezenchimális őssejteknek, amelyek a műanyag tenyésztőedény aljára kitapadnak, fibroblaszt-szerű morfológiát mutatnak, valamint csont, zsír és porc irányú differenciációs képességgel rendelkeznek *in vitro*. Ezen kívül sejt felszínükön ki kell fejezniük a CD44, CD73, CD90 és CD105 antigéneket, viszont nem hordozhatják felszínükön a hematopoetikus, tehát vérképző

ős- és elődsejtekre, valamint az endotélsejtekre jellemző antigéneket: CD11b vagy CD14, CD34, CD45, CD79 α vagy CD19 és HLA-DR [6].

1.2 A mezenchimális őssejtek immunológiai sajátosságai

Kutatásaim szempontjából a mezenchimális őssejtek legfontosabb tulajdonságai a különleges immunológiai sajátágaikhoz köthetők. Az MSC-k nem vagy mérsékelten immunogének, mivel rendkívül alacsony szinten, vagy egyáltalán nem fejezik ki az MHC-I és MHC-II (fő hisztokompatibilitási komplex I és II) antigéneket. Emellett kiemelkedő gyulladásgátló és immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek *in vitro* és *in vivo* egyaránt [7-10]. Gyakorlatilag a természetes és adaptív immunrendszer összes sejtj típusának működésére képesek gátló hatást kifejteni [11-13] (2. ábra).



2. ábra: A mezenchimális őssejtek immunszuppresszív aktivitása

Forrás: Alan Tyndall: *Mesenchymal stem cell treatments in rheumatology – a glass half full?* Nature Reviews Rheumatology; 10, 117–124 (2014)

A fő mechanizmus, amely felelőssé tehető az MSC-k immunrendszerre gyakorolt gátló hatásáért a különböző citokinek és faktorok termelése – IL-10, transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF),

szolubilis HLA-G (sHLA-G), hepatocita növekedési faktor (HGF), prosztaglandin E2 (PGE₂), indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), nitrogén monoxid, hem oxigenáz-1 (HO-1) – melynek következtében egy lokális gyulladásgátló mikrokozonyezetet hoznak létre maguk körül [14-17]. Amellett, hogy gátolják a dendritikus sejtek differenciálódását és érését, a már érett dendritikus sejtek antigén-prezentáló és gyulladáskeltő képességét is csökkentik. Az M1 típusú, tehát gyulladással makrofágok mezenchimális őssejtek jelenlétében M2 típusú, gyulladásgátló vagy regulátor fenotípust vesznek fel. Az MSC-k feltehetően gátolják a B limfociták osztódását és differenciálódását is – bár ez valószínűleg nagyban függ a B-sejtek aktivációjának erősségétől is –, valamint a natív NK sejtek osztódására is gátló hatással vannak. Fontos kiemelni, hogy a mezenchimális őssejtek erőteljes szuppresszív hatást gyakorolnak a T limfocitákra is: redukálják az aktivált T-sejtek osztódását, elősegítik a regulátor T-sejtek képződését, valamint megváltoztatják a különböző T-sejt populációk citokin profilját [18,19].

1.3 A mezenchimális őssejtek terápiás alkalmazásának lehetőségei

Kiemelkedő gyulladásgátló és immunszuppresszív aktivitásuk folytán a mezenchimális őssejtek használata kiemelkedő terápiás lehetőségeket rejt magában [20]. Az MSC-k számos olyan rendellenesség esetén sikerrel alkalmazhatóak, melyek kiváltó oka a diszregulált és túlzott mértékű immunválasz. Ilyen rendellenességek például a graft versus host betegség (graft versus host disease, GVHD), az autoimmun Chron betegség, szklerózis multiplex, oszteoarthritisz, 1-es típusú diabétesz mellitusz, szisztémás lupusz erithematosus (SLE), vagy éppen a kísérletes autoimmun enkefalomyelitisz [10,21-23].

A mezenchimális őssejtek terápiás alkalmazása az MSC-k egy másik nagyon fontos tulajdonságához, a rendkívüli szövetregenerációs képességükhöz köthető. Számos olyan angiogén faktort termelnek – fibroblaszt növekedési faktor-2 (FGF-2), fibroblaszt növekedési faktor-7 (FGF-7), monocita kemotaktikus fehérje 1 (MCP-1), vérlemezke-eredetű növekedési faktor (PDGF), placenta-eredetű növekedési faktor (PIGF), transzformáló növekedési faktor β (TGF- β), vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF) –, amelyek az endotélsejtek és simaizomsejtek osztódását serkentik, és végeredményben az erek képződését (angiogenezis) és érését idézik elő [24]. Számos

olyan egyéb parakrin faktort is termelnek – mátrix metalloproteinázok (MMP), tumornekrózis-faktor α (TNF- α), plazminogén aktivátor –, amelyek az extracelluláris mátrix degradációjáért illetve fellazulásáért, valamint a sejtosztódás beindításáért felelősek, és végeredményben segítik a mátrix átrendeződését. Végül számos olyan faktort is termelnek, amelyek beindítják a sérült szövetekben a sejtosztódást és regenerációt, valamint gátolják a további apoptotikus folyamatokat, ezzel nagymértékben elősegítve a sérült szerv, szövet gyógyulását [25]. Ilyen faktorok például a HGF, inzulinszerű növekedési faktor 1 (IGF-1), stroma eredetű faktor 1 (SDF-1). Kiváló szövetregenerációs képességüknek köszönhetően nagyon sok klinikai kutatásban próbálkoznak a mezenchimális őssejtek terápiás alkalmazásával például szív-elégtelenség, májat, vesét vagy csontszövetet érintő betegségek, ateroszklerózis vagy éppen stroke kezelésében [26].

Lehetséges terápiás alkalmazásuk harmadik, szintén intenzíven kutatott irányvonala a mezenchimális őssejtek kiemelkedő differenciációs képességével hozható összefüggésbe [27]. A regeneratív orvoslás egyik legígéretesebb területe a mezenchimális őssejtek különböző csontpótlások során történő felhasználása, mivel trauma, tumor, vagy épp a felnőttkori periodontitisz során felhasználható autológ, vagy akár allogén csontgraftok előállítására ezek a sejtek kiváló megoldást jelenthetnek. Más vélemények szerint az *ex vivo* növesztett és differenciált MSC-k a csontszövet mellett az izomszövet, porcszövet vagy ín regenerálására is alkalmasak lehetnek [28].

1.4 Mezenchimális őssejtek immortalizálása

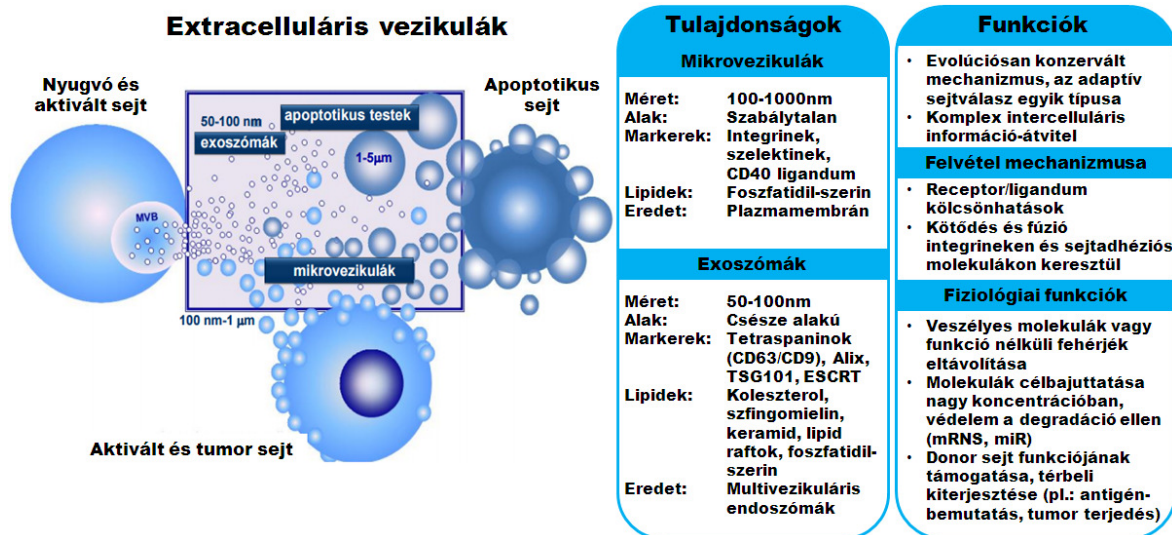
Az emberből származó mezenchimális őssejtek – bár *in vitro* tenyésztésük során egy ideig osztódóképesek maradnak – osztódásuk során fokozatosan öregszenek, plaszticitásuk csökken, míg végül szenescenciát mutatnak és tovább már nem szaporíthatóak. A mezenchimális őssejtek felhasználásával végzett *in vitro* munkák reprodukálhatósága nagymértékben megkérdőjelezhető, mivel a kísérletek során általában különböző donorokból származó, és nagyon eltérő élettartamú primer sejteket használnak. Tovább nehezíti a helyzetet, hogy például az egészséges donorokból izolált csontvelő-eredetű MSC tenyészetek feltűnő heterogenitást mutatnak a növekedés, valamint a differenciálódási képesség tekintetében is, és ez a heterogenitás semmilyen

módon nem hozható összefüggésbe a donorok életkorával vagy nemével [29]. Ez a heterogenitás kiküszöbölhető egy adott donor őssejtjeinek ismételt felhasználásával, viszont az MSC-k plaszticitása egy idő után – az általában meglehetősen intenzív *ex vivo* tenyésztés miatt – radikálisan csökken, mígnem bekövetkezik a szenescencia állapota [30]. Mind a heterogenitás, mind a replikatív szenescencia problémája kiküszöbölhető primer MSC kultúrákból létrehozott immortalis sejtvonalak létrehozásával. Mivel a sejtek szenescenciája együtt jár a telomerák rövidülésével, a jelenleg használatos immortalizációs stratégiák jellemzően magukban foglalják a telomeráz reverz transzkriptáz (hTERT) erőltetett expresszióját. Magas exogén hTERT expresszió segítségével már sikeresen immortalizáltak emberből, törpemalacból, illetve rhesusmajomból származó csontvelő-eredetű mezenchimális őssejteket [31-34]. Mindazonáltal számos kutatócsoport azt találta, hogy humán primer sejtek immortalizálásához a telomeráz aktivitás helyreállítása önmagában nem elegendő [35,36]. Ebből kifolyólag más csoportok humán csontvelő- és placenta-eredetű MSC-k esetében az exogén hTERT bevitelét kombinálták más gének kifejeztetésével, mint például a humán papillómavírus (HPV) E6/E7 onkoproteint, vagy a p16^{Ink4a} antagonistá Bmi-1 proto-onkogént kódoló gének bevitelével [37,38]. Bár bizonyos esetekben bizonyítottan elegendő volt a hTERT bevitele, más források viszont arról számoltak be, hogy a telomeráz aktivitás helyreállítása mellőzhető lehet bizonyos kondíciók mellett: a HPV E6/E7 gén kifejeztetése csontvelő-eredetű MSC-k esetében [39], valamint a c-MYC gén kifejeztetése embrionális őssejtekből differenciáltatott MSC-k esetében önmagában is elégségesnek bizonyult [40].

1.5 Az extracelluláris vezikulák csoportosítása, jellemzői

Az elmúlt időszakban az extracelluláris vezikulák (EV-k) szerepe a legkülönbözőbb membrán proteinek és citoplazmatikus komponensek irányított sejtközi transzportjában egy nagyon intenzíven kutatott tudományterületté nőtte ki magát [41,42]. Az extracelluláris vezikulák olyan foszfolipid kettős membránnal határolt szubcelluláris struktúrák, amelyek biológiai és fizikai paramétereik alapján további három fő csoportra oszthatóak: exozómák (exosomes, EXO), mikrovezikulák

(microvesicles, MV) és apoptotikus testek (**3. ábra**) [43,44]. A vezikulaképzés és az extracelluláris vezikulákkal történő kommunikáció egy evolúciósan konzervált



3. ábra: Az extracelluláris vezikulák általános jellemzése

Ábra forrása: Bence György et al.: *Membrane vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles*. Cellular and Molecular Life Sciences; Volume 68, Issue 16, pp 2667–2688 (2011)

mechanizmus, amely már a gram pozitív és gram negatív baktériumok esetében is megfigyelhető. Az ISEV (International Society for Extracellular Vesicles) nemzetközi tanácsa nemrégiben felállított egy minimális kritériumrendszert az extracelluláris vezikulák osztályozásához, mely elsősorban a partikulumok mérete, morfológiája, biofizikai és biokémiai paraméterei, funkcionális jellemzői, valamint a vezikulaképzés módja alapján határozza meg az egyes EV alpopulációkat [45]. A legnagyobb tudományos érdeklődés a mikrovezikulákat és az exoszómákat övezi. E két EV populáció közötti különbség elsősorban a méretbeli különbségükből adódik, de a vezikulaképzés mechanizmusa is teljesen eltérő: az exoszómák átmérője 50-100 nm közötti, és az ún. multivezikuláris testek exocitózisával jutnak az intercelluláris térbe spontán illetve különböző stimulusok hatására is [46,47]. A mikrovezikulák ezzel szemben nagyobb méretűek, 100-1000 nm átmérővel rendelkeznek, és közvetlenül a sejtet határoló plazmamembránról fűződnek le különböző stimulusokra [48]. Az extracelluláris vezikulák a sejtek közötti komplex információ-átvitelben töltenek be nagyon fontos szerepet, hiszen képesek a különböző vegyületek, fehérjék nagy

koncentrációban történő célba juttatására, és egyben védelmet nyújtanak számos molekula – különböző ribonukleinsavak, miRNS, mRNS – számára a degradáció ellen [49]. Nagyon fontos szerepet töltenek be a donor sejt funkciójának támogatásában, illetve térbeli kiterjesztésében, mint például az antigénbemutatás MHCII-antigén komplex szállításával, vagy a tumorsejtek terjedésének elősegítése. Az extracelluláris vezikulák metaanalízise során kiderült, hogy a MV és EXO fehérjék közötti átfedés bár jelentős, mégis alapvetően sok eltérés van a két vezikula populáció által szállított molekulák minőségében, mely természetesen a funkcionális különbségekben is megmutatkozik [50]. Az exoszómákra és mikrovezikulákra egyaránt jellemző, hogy rengeteg membrán asszociált proteint – köztük nagyon sok membrán receptort –, viszont nagyon kevés sejtmagi fehérjét tartalmaznak. Mind a két EV populációra jellemző, hogy a nem kódoló RNS molekulákon kívül nagyon sok miRNS-t és mRNS-t szállítanak, amit a sejtek át is írnak, miután felvették. A miRNS-ek poszttranszkripció szabályozásért is felelősek és epigenetikus változásokban is szerepük van. Az exoszómáknak ezen kívül az MHCII-peptid komplexek szállításában és az antigén prezentációban is szerepük van, valamint számos nem klasszikus módon (leaderless, nincs N-terminális szignálszekvencia) szekretálódó fehérje szekréciójáért is felelősek [51,52].

Az extracelluláris vezikulák felvétele történhet direkt membrán fúzióval, fagocitózissal, klatrin-mediált endocitózissal, kalveolin-mediált endocitózissal, makropinocitózissal és lipid raft-mediált endocitózissal is. Ez a folyamat speciális receptor-ligand kölcsönhatásokon alapul, tehát csak azok a recipiens sejtek képesek felvenni ezeket a vezikulákat, amelyek specifikus kötést tudnak kialakítani a vezikulák felszínén hordozott receptorokkal vagy ligandumokkal. A folyamatban a következő makromolekulák játszanak meghatározó szerepet: tetraspaninok, integrinek, immunglobulinok, proteoglikánok és lektinek, illetve ezek felismerő receptorai [53].

1.6 A mezenchimális őssejt eredetű extracelluláris vezikulák jellemzői, immunszuppresszív aktivitása

Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák immunmoduláló aktivitása mind ez idáig egy kevésbé kutatott tudományterületnek számított, azonban az elmúlt években ez a

témakör tekintélyes tudományos és klinikai érdeklődést vonzott [54,55]. Az MSC-k meghatározó jellemzője más sejttípusokhoz képest, hogy megőrzik a különböző differenciált szövetekbe történő migrációs képességüket. Számos tanulmány bizonyította már egyértelműen, hogy a mezenchimális őssejtek szisztematikus vagy lokális jelenléte esetén ezek a sejtek képesek szelektíven a sérült vagy a tumoros szövetekbe vándorolni [56-58]. Ezzel kapcsolatos az a megfigyelés, hogy különböző patológias kondíciók esetén a cirkuláló MSC-k száma megnő. Eszerint feltételezhető, hogy szükség esetén nagyszámú MSC mobilizálható például sérülésre adott válaszreakcióként a károsodott szövetek regenerálása érdekében [59,60]. A migrációjuk hátterében a szöveti sérülés következtében felszabaduló gyulladáscsökkentő citokinek állhatnak, ugyanis az MSC-k számos növekedési faktor receptort – ilyen például a korábban már említett PDGF és IGF-1 receptorai –, valamint kemokin receptort expresszálnak, mint például a CCR2, CCR3, CCR4 és CCR5 [61]. Valószínűsíthetően a CXCR4 receptor is fontos szerepet játszik az MSC-k migrációjában, hiszen a károsodott szövetekben nagy mennyiségű SDF-1 (CXCL12) szabadul fel. Bár a receptorok sűrűsége az őssejtek felszínén kicsi, a kemokin stimuláció hatására mobilizálható intracelluláris CXCR4 szint nagyon magas [62].

Nagyon fontos kérdés még napjainkban is, hogy az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák megtartják-e az eredeti sejtek azon tulajdonságát, hogy képesek közvetlenül a sérült szövetekben feldúsulni? A válasz még ma sem egyértelmű, mindazonáltal számos *in vivo* tanulmány számolt be az intravénásan adott MSC-eredetű exoszómák szövetregeneráló hatásáról, ráadásul ezek a partikulumok terápiás miRNS molekulák célzott kézbesítésére is használhatók lehetnek [63,64].

Az már bizonyított, hogy az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák olyan mRNS molekulákat szállítanak, amelyek immunmoduláló hatású fehérjéket kódolnak [65]. Ezen kívül olyan miRNS molekulák dúsulnak fel bennük, amelyek funkciója egyértelműen összefügg az immunrendszer szabályozásával [66]. A proteomikai analízisek eredményeként kiderült az is, hogy az MSC-EV-k számos olyan fehérjét tartalmaznak, amelyek a gyulladáscsökkentő folyamatok során játszanak szerepet [50,67,68]. Annak ellenére, hogy a biológiailag aktív molekulák tekintetében a mikrovezikulák és exoszómák között jelentős különbség valószínűsíthető az eltérő eredetükből kifolyólag [49], a pontos szerepük a mezenchimális őssejtek parakrin hatásaiban még ma sem tisztázott. Emiatt

az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák szerepének vizsgálata a gyulladásos folyamatokban, szövetregenerációban, valamint az immunrendszer gátlásában robbanásszerű érdeklődést mutat [69-73].

1.7 Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák T limfocitákra gyakorolt gátló hatása

Amíg az MSC-k által termelt citokineken és szolubilis faktorokon alapuló gátló hatásuk jól ismert, számos új tanulmány mutatott rá arra, hogy a közvetlen sejt-sejt kapcsolatok szintén meghatározó szerepet játszanak a T-sejtek funkcionális gátlásában. A B7-H1 és B7-H4 sejtfelszíni molekulák bizonyítottan gátolják a T-sejt aktivációt és proliferációt [74,75]. Az MSC-k sejtkapcsolat-függő gátló hatása kapcsán meg kell említeni a FasL/FAS-közvetített T-sejt apoptózis indukciót [76,77] valamint a Notch szignalizációs útvonal szerepét is [78]. A regulátor fenotípust mutató antigén prezentáló sejtek (APC) indukciója szintén sejtkapcsolat-függő mechanizmussal, a STAT3 szignalizációs útvonalon keresztül valósul meg, melynek eredményeképpen a limfociták aktivációja is gátlás alá kerül [79].

Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák szerepe a T limfociták funkcionális gátlásában még kevésbé tisztázott. Mostanáig mindössze néhány tanulmány született, amelyekben a T limfocitákra gyakorolt immunmoduláló szerepüket vizsgálták, viszont az eredmények meglehetősen ellentmondásosnak bizonyultak azzal kapcsolatban, hogy az EV-k hatékonysága *in vitro* kísérletek során megközelíti-e azt a szintet, amelyet az MSC-k közvetlen jelenléte biztosít [80-83]. Bár egyesek szerint az MSC-EV-k erőteljes gátló hatást gyakorolnak az aktivált T limfocitákra, némi aggodalomra adhat okot, hogy egy, a Cell Transplantation nevű folyóiratban megjelent tanulmány szerint a perifériás vérből izolált mononukleáris sejteknek csak egy kis része volt képes bizonyítottan felvenni az MSC-eredetű extracelluláris vezikulákat, és ezt a PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cell) szubpopulációt kizárólag B limfociták alkották [84]. Egy másik kutatócsoport megvizsgálta a PBMC sejteket – T- és B limfocitákat, NK sejteket, valamint monocitákat –, hogy képesek-e felvenni az MSC-eredetű extracelluláris vezikulákat, és azt találták, hogy legkevésbé a T sejtek képesek ezeket a partikulumokat

valamilyen formában felvenni, ráadásul eredményeik szerint az EV-k semmilyen hatással nem voltak az aktivált T-sejtek osztódási képességére [83].

2. Célkitűzések

1. Elsődleges célunk a T limfociták és zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek közötti transzportfolyamatok vizsgálata volt, melynek során a membrán összetevők és a citoplazma transzportját egyaránt nyomon követtük. Ebben a folyamatban külön megvizsgáltuk az egyes extracelluláris vezikula populációk – mikrovezikulák és exoszómák – szerepét, és összehasonlítottuk a ko-kultúrában lezajló folyamatokkal. A sejtmembrán jelölését PKH67 fluoreszcens festék segítségével végeztük, a citoplazma átadását pedig calcein-esszé segítségével követtük nyomon.
2. A humán T limfociták mellett C57Bl6 törzsből származó egér timociták, humán Jurkat limfóma sejtek, valamint zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek között is megvizsgáltuk a membrán és citoplazma komponensek átadásának hatékonyságát, és az emberi MSC-k mellett egérből származó, szintén zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteket is felhasználtunk. Az allogén kísérleti modellek mellett tehát xenogén modellek tesztelését és célul tűztük ki.
3. A citoplazmatikus komponensek átadásának pontos folyamatát tisztázandó megvizsgáltuk külön a mikrovezikulák, valamint a közvetlen sejt-sejt kapcsolatok jelentőségét is. A fluoreszcens calcein átadását a T limfociták és humán MSC-k között a ko-kultúrák konfokális mikroszkópos vizsgálatával próbáltuk kideríteni, ahol a membrán jelölést DiI, a citoplazma jelölését pedig calcein-esszé segítségével végeztük.
4. A mezenchimális őssejtek T limfocitákra gyakorolt immunszuppresszív aktivitásának vizsgálatára a T-sejtek receptor-specifikus, vagy mitogénnel történő aktiválását követően került sor. A T-sejt proliferáció gátlásán kívül – melynek vizsgálatához két különböző esszé is alkalmaztunk (resazurin és CFSE sejtproliferációs esszé) – a citotoxikus és helper T-sejtek interferon-gamma termelésének gátlását is megvizsgáltuk. A kísérletek során külön megvizsgáltuk a humán Zs-MS-eredetű mikrovezikulák és exoszómák dóziszfüggő hatását, az extracelluláris vezikuláktól mentesített MSC-kondicionált médium hatását hígítási sort is alkalmazva, valamint a

közvetlen ko-kultúrák esetében fellépő T-sejt proliferáció és IFN- γ termelés gátlását. Ezeknél a kísérleteknél allogén kísérleti modellt alkalmaztunk, a ko-kultúrákban különböző sejtarányokat is teszteltünk. A sejtosztódás gátlásának vizsgálatát Jurkat sejtek esetében is elvégeztük, külön megvizsgálva az MSC-eredetű MV-k, EXO-k, MSC-KM hatását, valamint a humán MSC-k közvetlen jelenlétéből adódó gátló hatást ko-kultúra modellekben.

5. Munkánk során emberi donorból származó, zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek immortalizálását is célul tűztük ki, melynek megvalósításához lentivirális génbeviteli eljárást alkalmaztunk. A különböző immortális sejtvonalak létrehozását más-más gének illetve génkombinációk bevitelével valósítottuk meg: hTERT, Bmi-1, hTERT+Bmi-1, hTERT+SV40T. Célunk a továbbiakban annak vizsgálata volt, hogy ezek a sejtvonalak továbbra is megfelelnek-e a mezenchimális őssejtekkel szemben támasztott kritériumrendszernek, hosszan tartó tenyésztés során is megtartják-e multipotens állapotukat, vagyis differenciációs képességüket, valamint megőrzik-e genomi stabilitásukat?

3. Módszerek

3.1 Sejtek izolálása és tenyésztése

Minden állatkísérletet az MTA Természettudományi Kutatóközpont Állatkísérleti Tudományos Bizottságának jóváhagyásával végeztünk, a vonatkozó erkölcsi irányelvek útmutatásainak maradéktalan betartásával. Az emberi primer sejtekkel történő munkavégzést a magyar Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) hivatalos engedélyével végeztük (Engedélyszám: 24083-3/2013/EHR). A kísérletek során felhasznált valamennyi szövetminta izolálása, illetve tudományos kísérletekben történő felhasználása a donorok – vagy kiskorú donor esetében a szülők vagy gondviselő – alapos szóbeli és írásbeli tájékoztatását követően, írásos beleegyezésükkel történt. A zsírszövet eredetű mezenchimális őssejtek két donortól, egy 5 éves kislánytól (csípőműtét során eltávolított és feleslegessé vált szövetmintából), valamint egy 30 éves felnőtt nőtől (zsírleszívást követően feleslegessé vált szövetmintából) származnak. Az egér zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteket fiatal felnőtt (10-12 hetesek), hím és nőstény C57Bl/6 egerek hasi és lágyéki zsírszöveteiből izoláltuk. A szöveti őssejteket kísérleteinkhez a 2. és 6. passzálás közötti időszakban használtuk fel. A zsírszövetet mosást követően (1 x PBS puffer) 0.1% w/v IV-es típusú kollagenázzal emésztettük (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA) 37°C-on 30 percig. Az emésztő enzimeket sejtenyészítő médium hozzáadásával állítottuk le (DMEM-F12 1:1 kiegészítve a következő összetevőkkel: 10% v/v FBS, 2 mM L-glutamine, és 50 µg/mL gentamicin). A sejtek további tenyésztéséhez a médiumot humán sejtek esetében hFGF-2-vel (1 ng/ml), egér sejtek esetében pedig ló szérummal (5% V/V) egészítettük ki. A timocitákat fiatal felnőtt hím és nőstény C57Bl/6 egerek tímuszából izoláltuk. A frissen eltávolított tímuszt RPMI-1640 tenyésztő médiumban mechanikailag roncsoltuk, majd a nagyobb szövetdaraboktól mentes sejtszuspenziót 60 µm-es nejlon szűrőn ((BD Falcon, Bedford, MA) keresztül szűrtük. A megmaradó timocitákat mostuk (1X PBS puffer), majd a sejtszám meghatározását követően tenyésztő médiumban tartottuk fenn. A humán T-sejteket 3 egészséges felnőtt donor (28, 31 és 32 éves donorok, két férfi és egy nő) perifériás véréből izoláltuk Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) reagens felhasználásával a gyártó útmutatásai alapján. A T-

limfoblaszt Jurkat sejt vonalat (E6-1 klón) az ECACC sejtbanktól (Salisbury, UK) vásároltuk. Az egér timocitákat, humán T-sejteket és Jurkast sejteket egyaránt RPMI-1640 médiumban tenyésztettük, 10% v/v FBS-el, 2 mM L-glutaminnal és 50 µg/mL gentamicinnel kiegészítve. A médiumokat, reagenseket és rekombináns hFGF-2-t a Thermo Fischer Scientific-től (Waltham, MA, USA) szereztük be. Minden sejt vonalat és primer sejtet teszteltünk mikoplazma fertőzöttségre MycoAlert Mycoplasma Detection Kit (Lonza, Basel, Svájc) segítségével.

3.2 Mikrovezikulák és exoszómák izolálása sejt kultúra felülúszókból

A mikrovezikula és exoszóma preparátumokat a differenciál centrifugálás és gravitációs szűrés kombinációjával állítottuk elő [85]. A sejt felülúszóból elsőként 300g erővel történő, 10 perces centrifugálással eltávolítottuk a sejteket, majd a sejt törmelékeket és apoptotikus testeket (2000g, 10 perc). A felülúszót ezt követően gravitációs szűrés segítségével teljesen megtisztítottuk az apoptotikus testektől, melyhez 0.8 µm pórusméretű korongfiltert használtunk (Millipore, Kenilworth, USA). A következő centrifugáláskor kapott pellet tartalmazta a mikrovezikulákat (12500g, 20 perc, szobahőmérséklet). Miután a 40 percig tartó, 20500g erővel történő újabb centrifugálással, valamint egy újabb gravitációs szűréssel (0,22 µm pórusméretű korongfilter, Millipore) eltávolítottuk a felülúszóból az összes mikrovezikulát, a homogén exoszóma izolátumok kinyeréséhez a felülúszót 100.000g erővel ultracentrifugáltuk 70 percen keresztül 4°C-on egy Beckman L7 ultracentrifuga segítségével, melyhez egy 70.1 TI típusú rotort használtunk (Beckman Coulter, Brea, CA). PBS pufferrel történő mosást követően az extracelluláris vezikulákat 1x PBS pufferben újra szuszpenzáltuk és fagyasztás nélkül azonnal felhasználtuk a további kísérletekhez.

3.3 Dinamikus fényszórás mérés (Dynamic light scattering analysis, DLS)

A dinamikus fényszórás méréseket a korábban meghatározott és beállított mérések alapján végeztük el [85]. A mérés során egy ALV goniométerhez szerelt CVI Melles Griot, 457.5 nm hullámhosszúságú diódalézert használtunk. A szórt fényt a

lézernyalábhöz viszonyítva 90°-ban detektáltuk. A méreteloszlás meghatározásához használt ún. autokorrelációs függvényt a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetében kifejlesztett szoftver segítségével határoztuk meg. A vezikulák méreteloszlásának meghatározásához a maximum entrópia módszert használtuk. A partikulumok pontos átmérőjének meghatározásakor a gömb alakzatok esetében használatos korrekciós függvényt alkalmaztunk, mivel a szórt fény intenzitása nagyobb méretű részecskék esetében erősen felülreprezentált.

3.4 Izon qNano technológián alapuló részecskeméret -és koncentráció meghatározás

Az ún. „*resistive pulse sensing*” jelenségen alapuló méréseket a korábban már meghatározott módon végeztük el [86] egy qNano készülék segítségével (IZON Science, Újzélend) az extracelluláris vezikulák méreteloszlásának és koncentrációjának meghatározásához. A kalibrációhoz ismert koncentrációjú, 203 nm és 340 nm átmérőjű (módusz) CPC200B és CPC400 gyöngyöket használtunk 1000-szeres hígításban. Konzekvensen mintánként legalább 500 eseményt regisztráltunk lineáris részecskeáramlás mellett, NP100 és NP400 nanopórus membránok felhasználásával, 45-47 mm közötti állandó feszítési távolságot alkalmazva. A mérési feszültséget 0,2-0,34 V közötti értékre állítottuk a stabil, 126-130 nA áramerősség és az alacsony RMS zajszint érdekében.

3.5 Transmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A mikrovezikulák méreteloszlásának és morfológiájának elektronmikroszkópos vizsgálatához az MV izolátumokat 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk 60 percig, majd 0,5%-os ozmium-tetraoxiddal utófixáltuk szintén 60 percig szobahőmérsékleten. Ezt követően a mintákat 1%-os uranil-acetát oldatban festettük 30 percig szobahőmérsékleten. Desztillált vízzel történő mosást és felszálló etil-alkoholos dehidratálást követően a mintákat hidrofíl LR white gyantába ágyasztuk és 24 órán keresztül 60°C-on inkubáltuk a gyártó utasítása szerint. Az ultravékony metszeteket

végül 50% metanolt tartalmazó, 4%-os uranyl-acetát oldatban (8 perc), majd ezt követően ólom-citrát lúgos oldatában (3 perc) kontrasztosítottuk.

A fixált (4%-os paraformaldehid) és újraszuszpendált exoszóma mintákat Formvar-carbon bevonattal ellátott EM gridekre vittük fel. A mintákat először uranyl-oxalát oldattal kontrasztosítottuk, majd 4%-os uranyl-acetát és 2%-os metil-cellulóz oldatok 1:9 arányú keverékébe ágyaztuk. A mintákat a teljes száradást követően egy JEOL JEM 1011 típusú transzmissziós elektronmikroszkóp segítségével vizsgáltuk 60 kV feszültség alkalmazásával. A képeket egy 11 megapixeles Olympus Morada kamera és az iTEM (Olympus) szoftver segítségével készítettük és elemeztük. Minden felhasznált anyagot és reagenst a Sigma-Aldrich-tól rendeltük.

3.6 A sejtek és extracelluláris vezikulák áramlási citometriás vizsgálata

Felhasznált antitestek: Alexa Fluor-488-konjugált Annexin V (Thermo Scientific), PE-konjugált anti-humán CD3 (561808), CD14 (555398), CD63 (556020), CD73 (550257), CD90 (555596) FITC-konjugált CD44 (560977), CD34 (345801), CD45 (555482), BV421-konjugált IFN- γ (562988) és FITC/PE-konjugált CD4/8 simultest (342407), APC-konjugált CD90 (559869), PerCP-Cy5.5-konjugált CD44 (560531), CD105 (560819), CD19 (332780), HLA-DR (562007); FITC-konjugált anti-egér Sca-1 (553335), PE-konjugált CD3 (561799), CD4 (557308), CD44 (553134), CD63 (564222) és CD90 (553014) (BD Biosciences, San Jose, CA). A sejteket és mikrovezikulákat - 1x PBS pufferrel történő mosást követően - inkubáltuk a megfelelő ellenanyagokkal 30 percig 37°C-on/szobahőmérsékleten (sejtek/MV-k). Ismételt mosást követően a sejteket 0,5% szarvasmarha szérumalbumint tartalmazó PBS pufferben (0,5% BSA/PBS), az MV mintákat pedig 1x PBS pufferben újraszuszpendáltuk. Annexin V jelölésnél mind a mosáshoz, mind pedig a jelöléshez annexin kötő puffert használtunk a gyártó utasításainak megfelelően. A megfelelő izotípus kontroll jelöléseknél az előzőekkel megegyező módon végeztük az antitestes jelöléseket a következő ellenanyagok felhasználásával (BD Biosciences): egér IgG₁-PE (345816), IgG_{2b}-FITC (555742), IgG₁-BV421 (562438), IgG₁/IgG_{2a} FITC/PE simultest (342409), IgG_{2a} PerCP-Cy5.5 (565364), IgG_{2b} PerCP-Cy5.5 (565380), patkány IgG_{2a}-FITC (554688), IgG_{2a}-PE (554689), IgG_{2b}-PE (553989). A mikrovezikula izolátumok vezikuláris természetének

igazolása érdekében – korábbi kísérletes rendszerben meghatározott módon [85] – a mintákhoz Triton X-100 detergenst adtunk 0.05% (V/V) végkoncentrációt alkalmazva. Ennek eredményeképpen az MV-k esetében korábban mért fluoreszcens jelek eltűntek – igazolva a partikulumok vezikuláris természetét.

Az exoszómák vizsgálatához elsőként az izolátumokban található partikulumokat 4 µm átmérőjű aldehid/szulfát csoportokkal bevont latex gyöngyök (Thermo Fischer) felületéhez kötöttük. Minden, 50 µl 1x PBS pufferben újrászuszpendált izolátumhoz 5 µl of latex gyöngyöt adtunk és a mintákat 15 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten. Ezt követően 110 µl 1x PBS puffer hozzáadásával háromszorosára hígítottuk az izolátumokat, majd 30 perces újabb inkubációt követően megfelelő mennyiségű 1M glicin hozzáadásával (100 mM végkoncentráció glicinre nézve) 30 percig inkubáltuk a mintákat szobahőmérsékleten. A következő lépésben megegyező térfogatú 2% BSA/PBS (V/V) puffert adtunk minden egyes mintához és inkubáltuk 2 órán keresztül szobahőmérsékleten. Végül 1x PBS puffer hozzáadásával 1,5 ml-re egészítettük ki a minták térfogatát, majd centrifugáltuk 2000g erővel 5 percig szobahőmérsékleten. Egy utolsó, 1x PBS pufferrel történő mosást követően a már gyöngyök felületéhez kötött exoszómákat PBS pufferben újrászuszpendáltuk és elvégeztük antitestes jelölésüket a korábban már részletezett módon. Az EV preparátumok vizsgálatát Attune áramlási citométer segítségével végeztük (Thermo Scientific), a mérési beállításokat és a vezikulák mérésre szolgáló kapukat korábbi eredmények alapján határoztuk meg [87] Megamix gyöngyök (BioCytex, Franciaország), és 1 µm átmérőjű Fluo-Green szilikon gyöngyök (Kisker, Németország) felhasználásával (**5. ábra**). A mintákat „high sensitivity” módban mértük le, az eredményeket az „Attune Cytometric Software v1.2” program segítségével értékeltük ki.

3.7 A sejtek és extracelluláris vezikulák jelölése fluoreszcens festékekkel – ko-kultúra modellek

A PKH67 fluoreszcens membrán jelölő festéket (PKH67 Fluorescent Cell Linker Kit, Sigma-Aldrich) a gyártó utasításainak megfelelően alkalmaztuk. A sejtek festését megegyező térfogatú szarvasmarha szérum (FBS), míg az EV-k festését azonos térfogatú 1% BSA/PBS hozzáadásával állítottuk le. A calcein-esszét (Sigma-Aldrich)

kizárólag élő sejtek jelöléséhez használtuk. A sejtek festését sejttenyésztő médiumban végeztük 250 nM Calcein AM végkoncentráció alkalmazásával 30 percig, 37°C-on. Az egér timocitákat, T-sejteket és Jurkat sejteket verapamillal kezeltük (10 µM végkoncentráció, 30 perc, 37°C) a fluoreszcens calcein sejtől történő kiáramlásának megakadályozása érdekében, melyért az MDR1 és MRP membrán transzporter fehérrék felelősek. A PKH67 vagy calcein AM festéseket követően a sejteket és EV mintákat egyaránt kétszer mostuk 1x PBS pufferrel. A DiI membránfestéssel (Vybrant DiI cell-labeling solution, Thermo Fischer) történő jelölését megelőzően a sejteket 1x PBS pufferrel mostuk, majd inkubáltuk a 37°C-ra előmelegített festékoldatban (5 µg/ml DiI végkoncentráció, 1x PBS pufferben hígítva) 5 percig. A sejteket ezt követően háromszor mostuk a sejttenyésztő médiummal a felesleges festék megkötése céljából. A ko-kultúra modellek esetében az MSC-k : T-sejtek/egér timociták/Jurkat sejtek aránya minden esetben 1:20 volt. A sejt – EV ko-kultúra modellek esetében a következő arányokat alkalmaztuk: 6×10^4 MV/sejt és 6×10^5 EXO/sejt átlagosan, de kísérleteink során más sejt – EV arányt is teszteltünk.

3.8 Konfokális lézer scanning mikroszkópia

A konfokális mikroszkópos vizsgálatokhoz µ-Slide üveg aljú konfokális kamrát használtunk (Ibidi, Martinsried, Németország). A kamra felületét humán plazma fibronectinnel (Millipore) vontuk be $10 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ koncentrációt alkalmazva. A T limfocitákat a perifériás vér mononukleáris sejteket (peripheral blood mononuclear cells, PBMCs) közül válogattuk ki FACS Aria áramlási citométer segítségével (BD Biosciences), PE-konjugált anti-CD3 ellenanyaggal történő jelölést követően. Az MSC-eket calcein AM festéssel, míg a humán T-sejteket DiI membránjelölő festéssel jelöltük a korábban már leírt módon, valamint a fordított felállást is teszteltük. A sejteket 1:20 arányú (MSC : T-sejt) ko-kultúra modellben vizsgáltuk 4, 12 és 24 óra elteltével. Az inkubációs idő elteltével a kultúrákat egy Olympus FluoView 500 konfokális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk meg 60x immerziós objektívet használva. Az Ibidi inkubációs rendszerének köszönhetően a mintákat mindvégig 37°C-on 5% CO₂ tenzió mellett vizsgáltuk. A felvételeket a „FluoView Application Software ver. 05.00.110” program segítségével értékeltük ki.

3.9 A mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű extracelluláris vezikulák és az MSC-kondicionált médium immunszuppresszív hatása az *in vitro* stimulált T limfocitákra és Jurkat sejtekre

Hogy megvizsgáljuk az MSC-eredetű MV-k és EXO-k *in vitro* stimulált T-sejtekre gyakorolt immunszuppresszív hatását, perifériás vérből származó mononukleáris sejteket tettünk egy 96-lyukú sejttenyésztő plate-re 8×10^4 db sejt/lyuk sűrűségben. A sejteket Dynabeads human T-Activator CD3/CD28 (Thermo Scientific) mikrogöngyök segítségével stimuláltuk lyukanként 2 μ l göngyöt a sejtekhez adva, így elérve az optimális 1:1 sejt- göngy arányt. Alternatív módszerként a sejteket Concanavalin A (Sigma-Aldrich) mitogén segítségével is aktiváltuk 2 μ g/ml koncentrációt alkalmazva. Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulákat ezután a sejtekhez adtuk a következő EV/sejt arányokat alkalmazva: 3×10^4 MV/sejt, 6×10^4 MV/sejt, 12×10^4 MV/sejt, valamint 3×10^5 EXO/sejt, 6×10^5 EXO/sejt és 12×10^5 EXO/sejt átlagosan. Stimulálatlan T-sejtek osztódási képességét is megvizsgáltuk, valamint teszteltük az MSC-kondicionált médium (MSC-KM) hatását is hígítatlan vagy különböző mértékben hígított formában. Pozitív kontroll kísérleteinkben Zs-MSC – aktivált T-sejt ko-kultúrákban is megvizsgáltuk a T-sejtek osztódási képességét 1:5, 1:10, 1:20 és 1:50 MSC – T-sejt arányok mellett. A Zs-MSC-eredetű EV-k Jurkat sejtek osztódási képességére gyakorolt hatásának vizsgálatakor a limfóma sejteket nem stimuláltuk sem mikrogöngyökkel, sem concanavalin A-val. Az EV/sejt arányok ebben az esetben a következők voltak: 3×10^4 MV/sejt, illetve 3×10^5 EXO/sejt. A Jurkat sejteket szintén 96-lyukú sejttenyésztő plate-en tenyésztettük 5×10^4 db sejt/lyuk sűrűségben. Ezeknél a kísérleteknél szintén teszteltük a hígítatlan MSC-KM hatását, a ko-kultúra modelleknél pedig rendre 1:10 sejtarányt alkalmaztunk (MSC:Jurkat). A sejtosztódás sebességének kvantifikálásához a resazurin redukciós esszét (Sigma-Aldrich) használtuk 0,1 mg/ml resazurin koncentrációt alkalmazva. 1 órás, 37°C-on történő inkubációt követően (5% CO₂ tenzió mellett) a sejtfelülűszókat egy 96 lyukú optikai plate-re vittük át, majd a resorufin fluoreszcencia intenzitását 540 nm gerjesztést követően 579 nm hullámhosszúságon mértük le egy Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Victor X3 plate olvasó segítségével.

3.10 Intracelluláris interferon-gamma (IFN- γ) immunesszé

Az intracelluláris IFN- γ szint méréséhez a perifériás vérből izolált mononukleáris sejteket CD3/CD28 mikrogyöngyök vagy concanavalin A segítségével stimuláltuk 24 órán keresztül MSC-eredetű MV-k vagy EXO-k jelenlétében. A 18. órában a sejteket monensinnel kezeltük (Sigma-Aldrich) $8 \mu\text{g}/10^6$ sejt koncentráció mellett. 24 óra elteltével a sejteket anti-CD4-FITC/anti-CD8-PE ellenanyagokkal jelöltük, majd fixáltuk és permeabilizáltuk Fix&Perm cell permeabilization reagents (Thermo Fischer) segítségével. Végül BV421-konjugált anti-IFN- γ antitesttel jelöltük a sejteket, és áramlási citométerrel meghatároztuk az IFN- γ pozitív T-sejtek arányát a CD4+ vagy CD8+ T-sejt populáción belül. A proliferációs esszéhez hasonlóan ebben az esetben is megvizsgáltuk az MSC-KM, valamint az MSC-k közvetlen jelenlétének hatását is 1:20 MSC – T-sejt arány mellett.

3.11 Karboxifluoreszcein szukcinimidil észter (CFSE) sejtproliferációs-esszé

A T limfociták proliferációjának gátlását CellTrace CFSE sejt proliferációs kit (Thermo Scientific) segítségével kvantifikáláltuk. A CFSE jelöléshez 1×10^7 db humán perifériás vérből izolált mononukleáris sejtet mostunk 1x PBS pufferrel, majd újraszuszpendáltuk 1 ml 5%-os (V/V) magzati szarvasmarha-szérumot tartalmazó PBS pufferben (FBS/PBS). A CFSE törzsoldatból olyan mennyiséget adtunk a sejtszuszpenzióhoz, hogy a CFSE végkoncentrációja $1 \mu\text{M}$ legyen ($0,2 \mu\text{l}/1 \text{ ml}$ FBS/PBS). A mintákat 5 percig inkubáltuk szobahőmérsékleten fénytől védett helyen, majd összesen háromszor mostuk 10 ml 5%-os (V/V) FBS/PBS oldattal szintén szobahőmérsékleten. A mosások alkalmával a sejteket 300g erővel centrifugáltuk 5 percig. A CFSE-jelölt sejteket 96 lyukú sejtenyésző plate-en növesztettük különböző körülmények között (EV-k jelenlétében, MSC-KM-ban illetve közvetlen kultúrában), a T-sejt stimulációt a korábban már részletezett módon végeztük CD3/28 mikrogyöngyök és ConA segítségével. A sejtosztódást a 4. napon elemeztük áramlási citométer segítségével. Azon sejtek százalékos arányát vettük figyelembe a proliferációs gátlás kiszámításához, amelyek legalább 4 sejtosztódáson keresztülmentek a kísérlet során. A proliferációs gátlást a következő képlet alapján állapítottuk meg: (proliferáció

százalékos aránya különböző körülmények között növesztett T-sejtek esetében: MSC-EV-k jelenléte, MSC-KM, ko-kultúra / proliferáció százalékos aránya aktivált, kezeletlen T-sejtek esetében) x 100.

3.12 Prostaglandin E₂ immunesszé

Dynabeads CD3/CD28 mikrogyöngyök segítségével specifikusan aktivált T limfociták felülúszójából izoláltunk exoszómákat és mikrovezikulákat. Az extracelluláris vezikulákat zsírszövet eredetű mezenchimális őssejtek tenyészetéhez adtuk különböző koncentrációkban: $1,5 \times 10^4$ MV/sejt, 3×10^4 MV/sejt, 6×10^4 MV/sejt, illetve $1,5 \times 10^5$ EXO/sejt, 3×10^5 /sejt és 6×10^5 EXO/sejt, átlagosan. 48 óra inkubációt követően a Zs-MSC felülúszó prostaglandin E₂ tartalmát Prostaglandin E2 Parameter Assay Kit (R&D System, Minneapolis, USA) segítségével határoztuk meg a gyártó útmutatásai alapján.

3.13 Lentivirális génbevitel

A pLOX-gfp-iresTK, pLOX-TERT-iresTK, pLOX-CWBmi1, és pLOX-TERT-ires-Ttag (a továbbiakban rövidítve: LV-GFP, LV-hTERT, LV-Bmi-1, and LV-SV40T) lentivirus vektorokat, valamint a második generációs pakoló vektorokat (psPAX2 és pMD2G) Didier Trono laboratóriumából (Lausanne, Svájc) szereztük be, melyek eredetileg az Addgene-től származnak (Cambridge, MA, USA). Az immortalizáló lentivektorokban található expressziós kazettát a citomegalovírus korai promotere hajtja meg. A lentivirus partikulumokat HEK293T sejtekkel termeltettük a lentivirus vektor és a két pakolóvektor ko-transzfekecióját követően. A transzfekecióhoz a kalcium-foszfátos ko-precipitációs módszert használtuk. Az MSC-k transzdukecióját megelőzően, a vírus titereket HEK sejtek különböző mennyiségű – LV-GFP transzgent kódoló – vírussal történő fertőzését követően határoztuk meg áramlási citométeres mérések alapján.

3.14 Kvantitatív valós idejű PCR (RT-qPCR) reakció provírus kópiaszám meghatározásához

A sejtizátumokból genomi DNS-t izoláltunk, majd az integrálódott provírus 59-bp hosszúságú szekvenciájára tervezett TaqMan próba (Thermo Scientific) segítségével végeztük el a kvantitatív meghatározást. A referencia gén minden esetben az RNase P volt, a PCR reakciókat egy StepOnePlus Real-Time PCR készülékben futtattuk. Az egy genomra vonatkoztatott átlagos provírus kópiaszámot az összehasonlító (comparative) C_T módszerrel határoztuk meg. A primerek és próbák szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: qPCR és valós idejű qPCR reakciók során használt primerek és próbák szekvenciái.

Célszekvencia	Forward primer	Reverse primer	Próba (FAM-MGB)
Integrálódott provírus	CCG AAC AGG GAC TTG AAA GC	CGA GTC CTG CGT CGA GAG A	AAA GGG AAA CCA GAG GAG
RNase P (genomiális)	AGC TGA GTG CGT CCT GTC ACT	TCT GGC CCT AGT CTC AGA CCT T	CAC TCC CAT GTC CCT T
hTERT (cDNS)	TaqMan assay # Hs00972650_m1 (Thermo Fischer)		
Mouse Bmi-1 (cDNS) ¹	TTA ATG TGT GTC CTG TGT	GAA GAG TTT TAT CTG ACC	-
SV40 large T antigén ¹	CAG GCA TAG AGT GTC TGC	CAA CAG CCT GTT GGC ATA TG	-
Béta-aktin (cDNS)	CCA GGT CAT CAC CAT TGG C	TCC TTC TGC ATC CTG TCG G	-

¹ Nguyen et al., *J Hepatol.* 2005 Dec;43(6):1031-7. alapján

3.15 Génexpressziós vizsgálatok

RNS-t 2×10^5 - 1×10^6 számú sejtől izoláltunk TRIzol reagenssel (Thermo Scientific) a gyártó utasításai alapján. A cDNS átírást 1 µg RNS templárról végeztük random primerek felhasználásával, a Promega (Madison, WI, USA) által forgalmazott Reverse Transcription System segítségével. A hTERT, Bmi-1 és SV40T expressziós szinteket Power SYBR Green vagy TaqMan reagensek használatával végeztük (Thermo Scientific) StepOnePlus Real-Time PCR készülékkel. A gének expressziós szintjét a β-

aktin referencia génhez viszonyítottuk. A megfelelő primerek és próbák szekvenciáit az 1. táblázat tartalmazza.

3.16 Immuncitokémia

A sejteket 24-lyukú sejttenyésztő plate-en növesztettük. A fixáláshoz 4%-os (V/V) paraformaldehid oldatot használtunk, az ellenanyagok aspecifikus kötődését 1% (V/V) BSA és 4% (V/V) szérum hozzáadásával akadályoztuk meg. A sejtek permeabilizálását 0,1%-os (V/V) Triton X-100 detergenssel végeztük. A megfelelő monoklonális, elsődleges antitestekkel – hTERT (Epitomics, Burlingame, CA, USA), humán/egér Bmi-1 (Millipore), SV40 large T antigén (Santa Cruz, Santa Cruz, CA, USA), RUNX2 (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) – vagy a megfelelő izotípus kontroll antitestekkel inkubáltuk a mintákat 4°C-on egy éjszakán át. A fluoreszcens detektáláshoz AlexaFluor (Thermo Scientific) vagy Northern Light (R&D Systems) másodlagos ellenanyagokat használtunk, a sejtmagokat pedig DAPI festéssel tettük láthatóvá.

3.17 Telomeráz aktivitás meghatározása

A telomeráz enzim funkcionális aktivitását a TRAPeze XL Telomerase Detection Kit (Millipore) segítségével határoztuk meg. Miután a mintákat a gyártó utasításai alapján feldolgoztuk, a PCR termékeket egy fekete 96-lyukú optikai plate-re vittük fel, majd 485 nm gerjesztés mellett a fluoreszcencia intenzitását 535 nm-en olvastuk le egy Victor X3 plate olvasó segítségével. Ezt követően a hígított PCR termékeket műanyag küvetába töltöttük, majd a fluoreszcencia intenzitást 600 nm gerjesztés mellett 620 nm hullámhosszon is leolvastuk egy Perkin-Elmer spektrofluoriméterrel. A telomeráz aktivitást a gyártó utasításai alapján számoltuk ki ezekből az adatokból.

3.18 A mezenchimális őssejtek csont és zsír irányú differenciációs képességének vizsgálata

A csont irányú differenciációs vizsgálatokhoz az alap sejtenyésztió médiumot kiegészítettük nem essenciális aminosavakkal, 0,1% (V/V) 2-merkaptóetanollal, 0,3 mM aszkorbinsavval, 10 mM β -glicerofoszfáttal és 100 nM dexametazonnal. Három hét elteltével a sejteket fixáltuk és immuncitokémiai vizsgálattal kimutattuk a RUNX2 transzkripciós faktort, valamint teszteltük az alkalikus foszfátáz aktivitást ALP pufferben oldott 0,02% (V/V) 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfáttal és 0.03 % nitro-kék tetrazoliummal. Az extracellulárisan felhalmozódott calciumot 2%-os alizarinvörös festékekkel tettük láthatóvá (pH 4.2).

A zsír irányú differenciációs képesség meghatározásához az alap tenyésztió médiumot kiegészítettük 100 nM dexametazonnal és 0,5 mM 3-izobutil-1-metilxanthinnal, majd 2 hét elteltével a sejtek fixálását követően (4% PFA) az intracellulárisan felhalmozódott lipidcseppeket olajvörös festékekkel (OilRed O) tettük láthatóvá (0,5%).

3.19 A sejtek szenescenciájának kimutatása β -galaktozidáz festéssel

A szenescencia-asszociált β -galaktozidáz festést a Millipore által forgalmazott Cellular Senescence Assay Kit segítségével végeztük. A sejteket 48 órás tenyésztió követően 24-lyukú plate-en festettük meg a gyártó útmutatásai alapján.

3.20 Kariotípus meghatározása

A sejtek osztódását metafázisban megállítottuk kolcemid kezeléssel (100 ng/ml) 70%-os konfluencia szint mellett. Három órás inkubációt követően a sejteket 0,075M KCl oldattal kezeltük, majd fixáltuk metanol és ecetsav 3:1 arányú elegyével, majd megszárítottuk. Rövid tripszines kezelést követően a kromoszómákat Giemsa festékekkel (Merck Chemicals, Darmstadt, Germany) festettük, és végül a kariogramokat LUCIA szoftver segítségével elemeztük ki (LUCIA Cytogenetics software, Laboratory Imaging, Prague, Csehország).

3.21 In vivo tumorképzés vizsgálat

Csoportonként 5 db, 8 hetes NOD SCID gamma törzsből származó egér (NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ) kapott szubkután injekció formájában egyenként 2×10^6 kontroll Zs-MSC-t, immortalizált Zs-MSC-t vagy HT1080 fibroszarkóma sejtet Matrigel-ben (BD Biosciences) szuszpendált formában. A HT1080 sejtekkel oltott állatokat 5 hét elteltével elaltattuk a tolerálhatatlan mértékű tumor növekedés miatt. A többi állatot 12 hét elteltével altattuk el és vizsgáltuk meg.

3.22 Sejtciklus vizsgálat

A tripszinnel kezelt sejteket mosást követően (0,5% BSA/PBS) 70%-os (V/V) jeges etanollal fixáltuk, majd jégen inkubáltuk 1 óráig. Ismételt mosást követően a sejteket 0,5%-os BSA/PBS pufferben újraszuszpendáltuk, majd propídium jodidot adtunk a pufferhez (40 $\mu\text{g/ml}$ végkoncentráció), és a DNS tartalmat FACSCalibur áramlási citométerrel (BD Biosciences) határoztuk meg. Az adatokat ModFit LT 3.0 szofver (Verity Software House, Topsham, ME, USA) segítségével értékeltük ki.

3.23 A provirus integrációs helyének pontos meghatározása – ligáció-mediált PCR (LM-PCR)

A lentivirális integrációs hely meghatározásához genomi DNS-t izoláltunk a sejt kultúrákból, melyet erőteljes emésztésnek tettünk ki. A provirus DNS szakaszt hordozó fragmenteket biotinnal jelöltük lineáris extenziót követően, melyeket olyan biotinilált primerek segítségével végeztünk, amelyek specifikusan kötődnek a provirális szekvencia 5' végéhez. A biotinilált DNS szakaszokat ezután streptavidines agaróz gyöngyökhöz (Thermo Fischer) kötöttük, majd egy blunt-end ligációs lépéssel egy univerzális adaptor szakaszt illesztettünk a biotinilált DNS-hez. Az így keletkezett DNS szakaszokat provirus –és adaptor specifikus primerek segítségével amplifikáltuk, majd a PCR termékeket szubklónoztuk pCR-2.1 TOPO (Thermo Scientific) vektorba, amit ezt követően TOP 10F' baktérium sejtekbe transzformáltunk, melyek kék-fehér szelekcióra képesek (Thermo Fischer). Számos kolóni tartalmazott nagyméretű DNS inzerteket,

melyeket PCR segítségével amplifikáltunk és megszekvenáltuk. A szekvenciákat a BLAST algoritmus segítségével azonosítottuk. A primerek és adaptorok szekvenciáit a 2. táblázat tartalmazza.

2. táblázat: A ligáció-mediált PCR (LM-PCR) módszer során használt oligonukleotidok

Név	Szekvencia
Blunt-end adaptor F	5'-phospho-CGTCCTAACTGCTGTGCCACT-3'
Blunt-end adaptor R	5'-GACCCGGGAGATCTGAATTCGAGTGGCACAGCAGTTAGGACG-3'
Biotinilált primer	5'-biotin-AGACCAATGACTTACAAGGCAGCTG-3'
HIV-LTR primer 1	5'-AGTGCTTCAAGTAGTGTGTGCC -3'
HIV-LTR primer 2	5'-GTCTGTTGTGTGACTCTGGTAAC -3'
Adaptor primer 1	5'-GACCCGGGAGATCTGAATTCG-3'
Adaptor primer 2	5'- AGTGGCACAGCAGTTAGGACG-3'

3.24 Statisztikai analízis

A mérési adatok ábrázolásánál az eredmények számtani átlagát \pm standard szórással ábrázoltuk. A statisztikai összehasonlításhoz Student-féle t-eloszlást alkalmaztunk, ahol a $P < 0.05$ értéket vettük szignifikáns különbségnek.

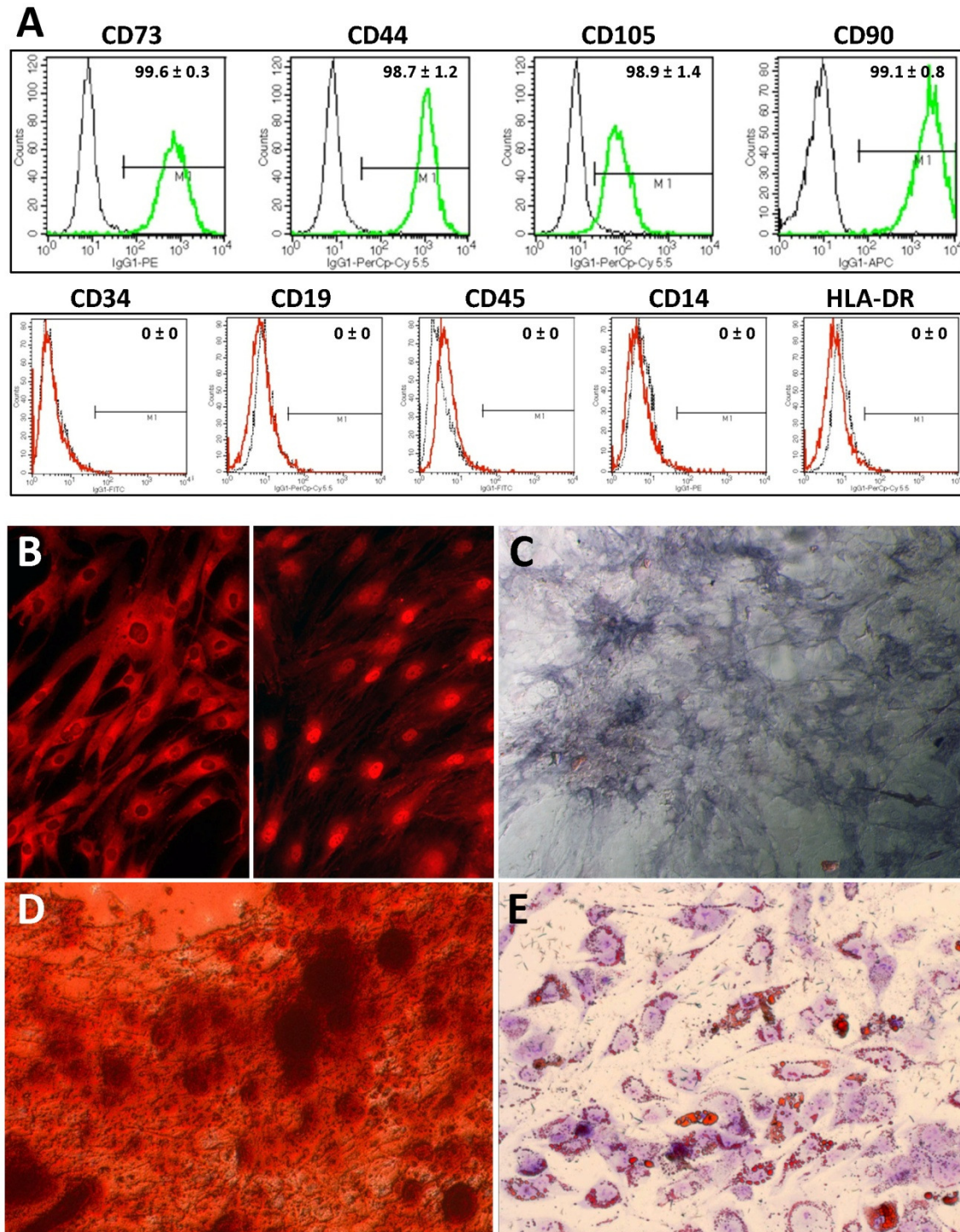
4. Eredmények

4.1 A primer mezenchimális őssejtek sejt felszíni markerei és differenciálódási képessége

A kutatásaink során felhasználásra került primer, zsírszövet eredetű mezenchimális őssejt tenyészeteket mindenekelőtt részletes vizsgálatoknak vetettük alá abból a célból, hogy tisztázzuk, vajon minden tekintetben megfelelnek-e az International Society for Cellular Therapy (ISCT) által támasztott kritériumrendszernek. A zsírszövet eredetű mezenchimális őssejtek két donortól, egy 5 éves kislánytól (csípőműtét során eltávolított és feleslegessé vált szövetmintából), valamint egy 30 éves felnőtt nőtől (zsírleszívást követően feleslegessé vált szövetmintából) származtak.

A plaztik adherencia esetükben egyértelműen teljesült. A továbbiakban a sejt felszíni antigén profilok vizsgálatát áramlási citometriás módszerrel végeztünk el. A mezenchimális őssejtekre jellemző sejt felszíni markerekre – CD44, CD73, CD90 és CD105 – mindkét izolátumból származó MSC populáció közel 100%-os pozitivitást mutatott az ismételt mérések alkalmával is. A vérképző rendszer ő- és elődsejtjeire jellemző antigénekre – CD14, CD19, CD34, CD45, HLA-DR – egyik izolátumból származó MSC populáció sem mutatott pozitivitást (**4. ábra A**).

A mezenchimális őssejtek differenciálódási képességének vizsgálatához a sejteket a megfelelő indukciós médiumban neveltük a szakirodalmi adatok alapján meghatározott ideig. A csontképződés vizsgálata során immuncitokémiai jelölés segítségével sikerült megállapítanunk, hogy mindkét izolátum esetében végbement a RUNX2 transzkripciós faktor sejt magba történő transzlokációja (**4. Ábra B**). A RUNX2 gén terméke (run-related transcription factor 2) egyfajta mester transzkripciós faktorként vesz részt az oszteogenezis folyamatában, melyben nélkülözhetetlen szerepet tölt be. A nem szövet-specifikus alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának nagymértékű fokozódása a csont irányú differenciáció során mindig kimutatható, az intenzíven osztódó oszteoblasztokra tipikusan jellemző, és biztosítja a csontmátrix megfelelő érését. A csont irányú differenciációs kísérleteink során mindkét MSC izolátum esetében sikerült kimutatnunk az ALP emelkedett aktivitását kromogén szubsztrát hozzáadásával (**4. ábra C**). Az extracelluláris állományban felhalmozódott kalciumot Alizarin vörös festéssel mutattuk ki a csont irányú differenciáció 14. napján (**4. ábra D**). A sejtek zsír irányú



4. ábra: Humán zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek differenciálódási képességének vizsgálata (A) Humán Zs-MSC-k sejtfelszíni markereinek áramlási citometriás vizsgálata. Felső sor (zöld színnel jelölve): ISCT által meghatározott MSC markerek vizsgálata; Alsó sor (piros színnel jelölve): hematopoetikus ős- és elődsejtekre jellemző antigének vizsgálata. A fekete vonalak a megfelelő izotípus kontroll jelölést mutatják. A hisztogramok a kétféle Zs-MSC izolátumon végzett független mérések eredményeit reprezentálják az átlagos pozitivitást és

szórást is feltüntetve **(B)** A RUNX2 transzkripció faktor immuncitokémiai jelölése a differenciáció 1. napján (baloldali képrészlet) és három hét elteltével (jobboldali képrészlet). **(C)** Alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának kimutatása kromogén szubsztrát hozzáadásával. **(D)** Az extracelluláris térben felhalmozódott kalcium kimutatása Alizarin vörös festéssel. **(E)** Zsír irányú differenciációs képesség vizsgálata Oil Red O festéssel.

differenciációs képességének vizsgálatához az MSC tenyészeteket megfelelő indukciós médiumban tartottuk 14 napig, majd olajvörös festéssel tettük láthatóvá a felhalmozódott lipidcseppeket, melyek jelenléte a zsírsejtek képződését egyértelműen bizonyítja **(4. ábra E)**.

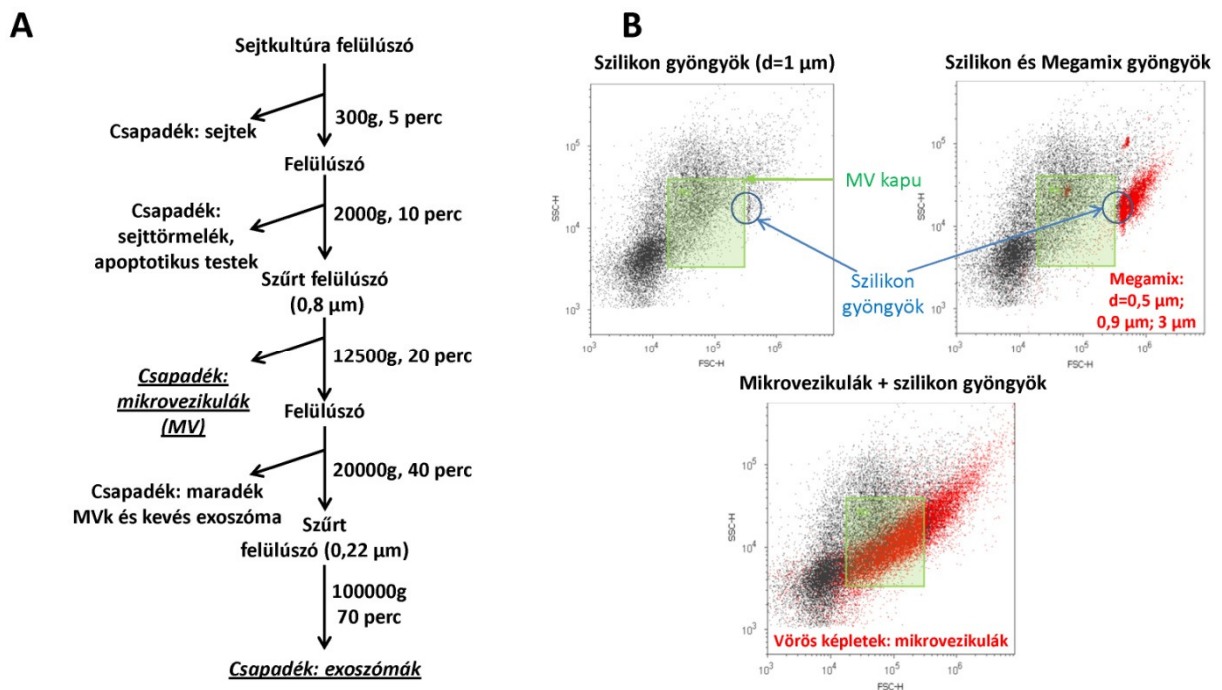
Eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy az általunk izolált primer mezenchimális őssejtek minden tekintetben megfelelnek az ISCT által támasztott kritériumrendszernek, mind sejtfelszíni markereik, mind pedig differenciációs képességük tekintetében.

4.2 Az extracelluláris vezikulák, szolubilis mediátorok és közvetlen sejtkapcsolatok szerepe a primer mezenchimális őssejtek és perifériás T limfociták, Jurkat limfóma sejtek és egér timociták közötti kommunikációban

A mezenchimális őssejt-eredetű extracelluláris vezikulák (EV) immunszuppresszív aktivitásának vizsgálata az utóbbi években jelentős tudományos érdeklődést váltott ki. Munkánk során elsődleges célként tűztük ki a membrán –és citoplazmatikus komponensek transzportfolyamatának részletes vizsgálatát a zsírszövet eredetű mezenchimális őssejtek és perifériás T-sejtek, egér timociták és Jurkat limfóma sejtek között. Ezen kívül a különböző kísérletsorozataink során külön-külön teszteltük az egyes extracelluláris vezikula alpopulációk – mikrovezikulák és exoszómák –, közvetlen sejt-sejt közötti kapcsolatok és az MSC-eredetű szolubilis mediátorok szerepét a humán perifériás T-sejtek, valamint Jurkat sejtek funkciójának gátlásában. A transzportfolyamatok hatékonyságát az allogén kísérleti rendszereken túl xenogén rendszerekben is megvizsgáltuk.

4.2.1 Extracelluláris vezikulák, mikrovezikulák és exoszómák izolálása és karakterizálása

Az extracelluláris vezikulákat humán illetve egér zsírszövetből származó mezenchimális őssejek (Zs-MSC-k), egér timociták, humán perifériás T sejtek és Jurkat sejtek tenyészetéből származó sejtfehérítől izoláltuk. A vezikula izolálást megelőzően a sejttenyésztő médiumot olyan médiumra cseréltük, amelyben az FBS-t KnockOut Serum Replacement reagenssel helyettesítettük, ugyanis a magzati szarvasmarha szérum is nagy számban tartalmaz extracelluláris vezikulákat, amelyek nem kívánatos módon befolyásolhatják a kísérleti eredményeket. A vezikulák termelésénél gondosan ügyeltünk arra, hogy a sejtek intenzív növekedési fázisban (log) legyenek körülbelül 90%-os konfluencia szint mellett, emiatt az egér timocitákat és humán perifériás T sejteket mitogénnel (concanavalin A) stimuláltuk. A különböző extracelluláris vezikula alpopulációkat differenciál centrifugálás és gravitációs szűrés kombinációjának segítségével izoláltuk illetve választottuk el egymástól (részletesen lásd: Anyagok és Módszerek fejezet, **5. ábra A**).



5. ábra: Extracelluláris vezikulák izolálási protokolljának sematikus ábrázolása, a mikrovezikulák áramlási citometriás analizéséhez használt MV kapu (A) Az extracelluláris

vezikulák izolálási protokolljának egyes lépései. A homogén MV és EXO izolátumokat minden esetben sterilre szűrt (0,22 μm) PBS pufferral mostuk és újra centrifugáltuk a további kísérleteket megelőzően. **(B)** Áramlási citometriában használatos sűrűségfelhő-képek, amelyek a mikrovezikulák direkt méréshez használt kaput (MV kapu) mutatják be. Az MV kaput 1 μm átmérővel rendelkező Fluo-Green szilikon gyöngyök, valamint Megamix gyöngyök (0,5 μm , 0,9 μm , 3 μm átmérő) segítségével határoztuk meg.

A frissen izolált mikrovezikula és exoszóma izolátumok jellemzésére - méreteloszlás és morfológiai sajátosságok - számos különböző vizsgálati módszert alkalmaztunk: dinamikus fényszórás mérés (dynamic light scattering, DLS), az ún. resistive pulse sensing, TRPS), transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM), áramlási resistive pulse sensing jelenségen alapuló Izon qNano technológia (tunable citometria (FACS) (**6. ábra**).

A DLS és Izon qNano mérések alapján elmondható, hogy a vezikula preparátumok nagyfokú egyezést mutattak a méreteloszlásuk tekintetében függetlenül attól, hogy milyen típusú sejt felülészójából izoláltuk. Ez a nagyfokú hasonlóság a mikrovezikula és exoszóma izolátumok esetében egyaránt megfigyelhető volt. Az exoszómák átmérője az 50-100 nm-es tartományba esett, míg a mikrovezikulákat jellemzően a 100-1000 nm közötti mérettartomány jellemezte. Az Izon qNano készülék segítségével az egyes vezikula populációk pontos koncentrációját is sikerült meghatároznunk. A reprezentatív, humán mezenchimális őssejt-eredetű mikrovezikula és exoszóma izolátumok esetében mért méreteloszlásról és pontos koncentrációkról a **6. ábra A** hisztogramjai nyújtanak tájékoztatást.

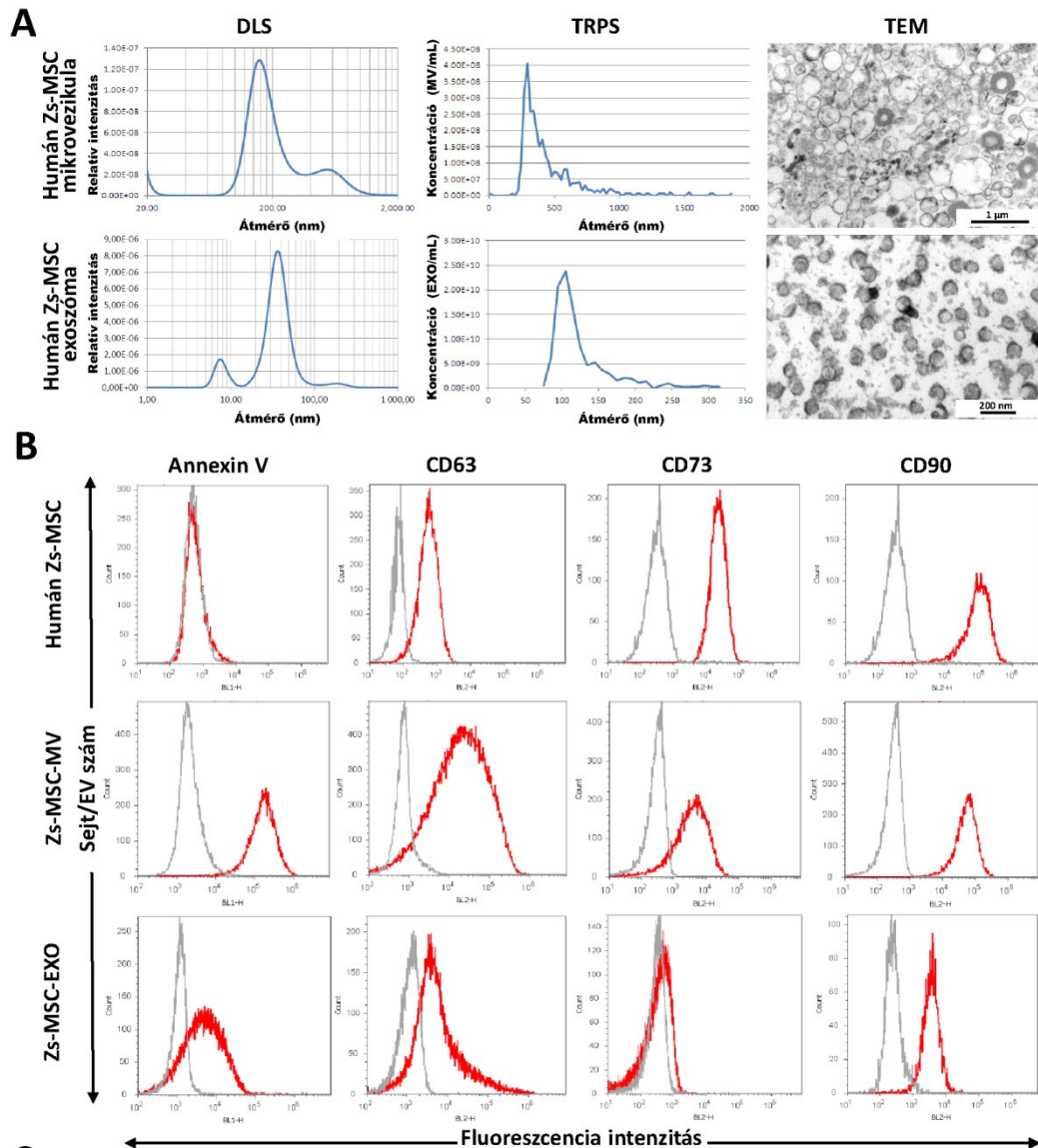
Az egyes EV izolátumok pontos koncentrációjának ismeretében lehetővé vált számunkra, hogy a kísérleteink során mindig megegyező, de legalább is nagyon hasonló mennyiségű mikrovezikulát vagy exozómát inkubáljunk együtt adott mennyiségű sejttel. Ebből a szempontból a humán mezenchimális őssejt szolgált egyfajta viszonyítási alapként az EV koncentrációk egységesítéséhez. A kísérleteink során következetesen 5×10^6 számú MSC felülészójából izoláltuk a különböző EV frakciókat 48 óráig tartó inkubációs periódust követően, az akceptor sejtek száma pedig mindig 1×10^5 volt.

A mikrovezikula (MV) preparátumokról – a transzmissziós elektronmikroszkópos elemzések alapján – általánosságban elmondható, hogy a termelő sejtek típusától

függetlenül átmérőjük a legtöbb esetben 400-500 nm közé esett, valamint a formájuk, méretük és elektron denzitásuk tekintetében sem tapasztaltunk eltérést. Fontos megjegyezni, hogy a TEM vizsgálatokat megelőzően a különböző EV populációkat eltérő módszerekkel készítettük elő. A mikrovezikulák preparálása során a pelletékből ultravékony metszeteket készítettünk, az exoszóma izolátumok esetében viszont a fixált és re-szuspendált részecskéket Formvar-karbon bevonattal ellátott réz EM gridekre vittük fel. A preparátum készítés részletes leírása az Anyagok és módszerek fejezetben szerepel.

Az Izon qNanao és TEM vizsgálataink alapján kijelenthetjük, hogy a mikrovezikulákkal ellentétben az exoszómák egyértelműen homogénebb populációt alkotnak méretük és elektron denzitásuk alapján egyaránt. Átlagos átmérőjük 80 és 100 nm közé tehető.

Az egyes extracelluláris vezikula alpopulációkat áramlási citometriás mérések segítségével is karakterizáltuk (**6. ábra B**). Ezeket a méréseket a különböző, extracelluláris vezikulákra jellemző markereket felismerő – Alexa Fluor 488-konjugált annexin V, anti-CD63 –, illetve az adott EV termelő sejtekre jellemző sejtfelszíni markereket felismerő, fluorofór-konjugált antitestekkel történő jelölés előzte meg. A mikrovezikulákat az előzetesen beállított MV kapu használatával közvetlenül tudtuk analizálni (**5. ábra B**), míg az exoszómákat csak 4 μm átmérővel rendelkező aldehid/szulfát latex gyöngyök felületéhez abszorbeálva sikerült analizálnunk (részletesen lásd: Anyagok és módszerek fejezet). A mikrovezikulák és exoszómák egyaránt magas pozitivitást mutattak annexin V-re – amely a foszfatidil-szerin externalizációt jelzi – illetve a CD63 tetraspaninra nézve. Az összes mikrovezikula izolátum esetében azt tapasztaltuk, hogy hordozzák azokat a tipikus sejtfelszíni antigéneket, amelyeket a termelő sejtek is. A humán mezenchimális őssejtek felülúszójából izolált mikrovezikulák például nagyfokú pozitivitást mutattak a CD73 és CD90 antigénekre.

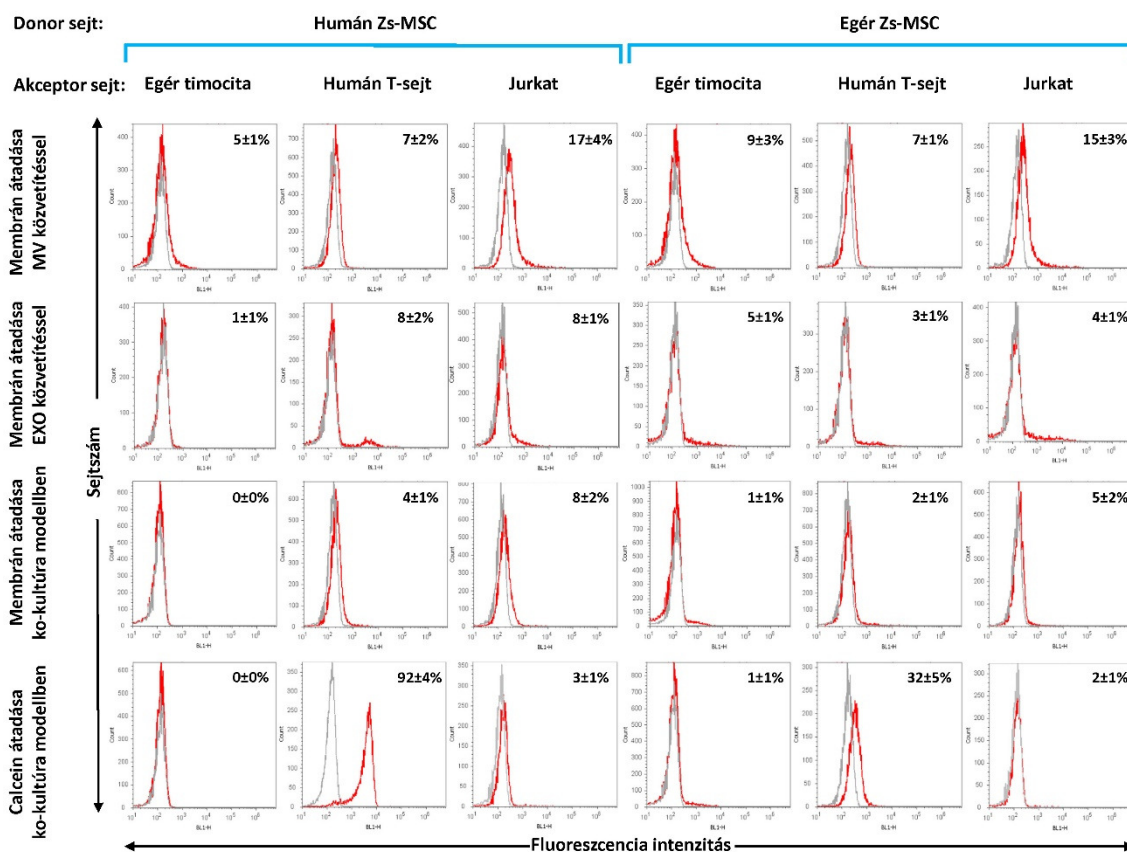


6. ábra: Humán Zs-MSC-eredetű mikrovezikulák és exoszómák méreteloszlása, morfológiai sajátosságai és áramlási citometriás karakterizálása (A) Extracelluláris vezikulák karakterizálása DLS, Izon qNano készülék és TEM segítségével. (B) Extracelluláris vezikulák áramlási citometriás vizsgálata. Az EV izolátumokat és a vezikulákat kibocsájtó sejteket egyaránt megjelöltük A488-konjugált Annexin V, PE-konjugált anti-CD63, anti-CD73 és anti-CD90 ellenanyagokkal (vastag piros vonallal jelölve). A vékony szürke vonalak a megfelelő izotípus kontroll jelölést mutatják. Minden hisztogram egy-egy reprezentatív mérés eredményét mutatja a legalább öt független kísérletről álló mérési sorozat közül.

Ezzel ellentétben minden exoszóma izolátum negatívnak bizonyult a GPI-horgonyzott CD73 ektonukleáz enzimre, bizonyítva ezen partikulumok eltérő szubcelluláris eredetét a mikrovezikuláktól.

4.2.2 Membrán vezikulák és citoplazmatikus eredetű anyagok átadásának vizsgálata a mezenchimális őssejtekből egér timociták, humán perifériás T limfociták és Jurkat sejtek irányába

Kísérleteink során elsőként a mezenchimális őssejt-eredetű membrán összetevők átadásának hatékonyságát vizsgáltuk a különböző eredetű akceptor sejtek – egér timociták, humán perifériás T limfociták, illetve Jurkat limfoblasztoid sejtek – irányába. A mezenchimális őssejt sejtmembránját PKH67 fluoreszcens membrán jelölő kit segítségével festettük meg, majd miután a sejtek teljesen letapadtak a műanyag tenyésztőedény felületéhez, jelöletlen egér timocitákat, humán T-sejteket vagy Jurkat limfóma sejteket tettünk az MSC kultúrához. A kísérlet során donor sejteknek nevezett egér vagy humán Zs-MSC-k, valamint az akceptor sejteknek nevezett timociták, T-sejtek vagy Jurkat sejtek aránya 1:20 volt. 24 óráig tartó együtt-tenyésztést követően az akceptor sejteket áramlási citométer segítségével vizsgáltuk a PKH67 zöld fluoreszcens festék jelenlétére (**7. ábra, 3. sor hisztogramjai**). A 6. ábrán látható eredmények alapján elmondható, hogy a ko-kultúra modell esetében – melynek időtartama minden esetben 24 óra volt – sem az egér timociták vagy humán perifériás T-sejtek, sem pedig a Jurkat sejtek esetében nem volt megfigyelhető PKH67, vagyis MSC eredetű membrán akkumuláció annak ellenére, hogy a különböző típusú sejtek meglehetősen hosszú ideig szoros kapcsolatban voltak egymással. Hasonlóképpen, a PKH67 pozitív mikrovezikulákkal vagy exoszómákkal történő kezelés hatására is csak elhanyagolható mértékű membrán akkumuláció volt megfigyelhető az akceptor sejtek esetében annak ellenére, hogy a legmagasabb dózis használatkor a vezikulákat óriási feleslegben adtuk hozzá a sejtekhez ($1,2 \times 10^6$ EXO/sejt és $1,2 \times 10^5$ MV/sejt). A **7. ábra** reprezentatív hisztogramjai a 6×10^4 MV/sejt és 6×10^5 EXO/sejt arányok használatával kapott eredményeket mutatják be (**7. ábra 1. és 2. sor hisztogramjai**). Az eredményeink alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy az egér timociták, humán perifériás T limfociták, sőt még a Jurkat limfóma sejtek sem akkumulálnak számottevő mennyiségű



7. ábra: Membrán komponensek és citoplazmatikus calcain átadásának vizsgálata a szöveti őssejtekből egér timociták, humán perifériás T limfociták és Jurkat sejtek irányába ko-kultúra modellben, mikrovezikulák vagy exoszómák közvetítésével. A méréseket áramlási citométer segítségével végeztük. Az első és második sor hisztogramjai az akceptor sejtek pozitívitasát mutatják a PKH67 festékre 24 órás inkubációt követően, amely során a sejteket PKH67 membránjelölő festék segítségével megjelölt mikrovezikulák vagy exoszómák jelenlétében tenyésztettük. A harmadik sor hisztogramjai az akceptor sejtek pozitívitasát mutatják a PKH67 festékre, miután 24 órán keresztül együtt tenyésztettük őket a PKH67 festék segítségével megjelölt mezenchimális őssejtekkel. A negyedik sor hisztogramjai az akceptor sejtek pozitívitasát mutatják calcainre, miután 24 órán keresztül együtt tenyésztettük őket calcain-AM segítségével megjelölt mezenchimális őssejtekkel. Minden egyes hisztogram legalább három független kísérletsorozat eredményét mutatja be, a százalékban megadott értékek az akceptor sejtek átlagos pozitívitasát jelzik.

membrán komponens az MSC eredetű extracelluláris vezikulák közvetítésével. Ráadásul kísérleteink során az allogén és xenogén modellek között sem tapasztaltunk érdemi eltérést.

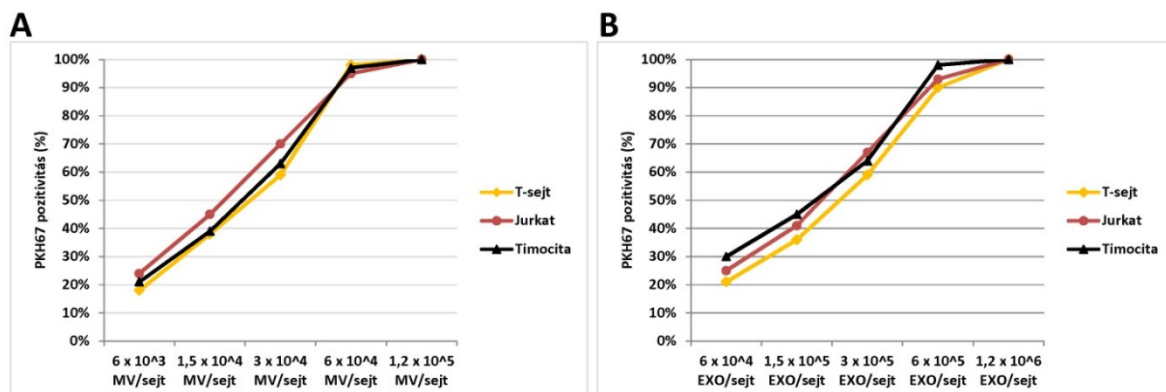
Annak érdekében, hogy tanulmányozzuk a citoplazmatikus komponensek átadását a szöveti őssejtek és T-sejtek között, elsőként az egér és humán szöveti őssejteket calcein-AM festékkel jelöltük. Ezt követően tudtuk nyomon követni a fluoreszcens calcein festék átadását egyik sejtről a másikra (**7. ábra, 4. sor hisztogramjai**). Érdekes módon azt tapasztaltuk, hogy egyedül a humán T limfociták akkumuláltak jelentős mennyiségű calceint a 24 órás ko-kultúra modellben. Ezen kívül jelentős eltéréseket figyeltünk meg az allogen és xenogén modellek között, amely arra enged következtetni, hogy minden bizonnyal a szöveti őssejtek valamely sejtfelszíni komponensének aktív felismerése játszik meghatározó szerepet a folyamatban. Amíg a humán T limfociták megközelítőleg 92%-a bizonyult pozitívnak a fluoreszcens calcein festékre a 24 órás, humán szöveti őssejtekkel történő inkubációt követően, addig az egér mezenchimális őssejt – T-sejt ko-kultúrák esetében a humán T-sejtek mindössze 32%-a lett pozitív a calcein festékre átlagosan. Az egér timociták és Jurkat limfóma sejtek a humán T limfocitákkal ellentétben nem akkumuláltak detektálható mennyiségű, humán vagy egér szöveti őssejtekből származó calcein festéket a 24 órás tenyésztést követően.

Fontos megjegyezni, hogy a calcein AM festék az MDR1 és MRP membrán transzporter fehérjék potenciális szubsztrátja, és ezek a transzporter fehérjék a perifériás T-sejtekben és a Jurkat sejtekben egyaránt kifejeződnek. Annak érdekében, hogy a festék eltávolítását megakadályozzuk a sejtekből, az akceptor sejteket minden esetben alávetettük egy 30 perces, 10 μM végkoncentrációban alkalmazott verapamil kezelésnek még a ko-kultúra kísérletek megkezdése előtt. A verapamil hatékonyan képes gátolni az MDR1 és MRP transzportereket anélkül, hogy a sejtek közötti transzportfolyamatokat gátolná.

4.2.3 Membrán vezikulák és citoplazmatikus eredetű anyagok átadásának vizsgálata egér timocitákból, humán perifériás T limfocitákból és Jurkat sejtekből a mezenchimális őssejtek irányába

A következő kísérleteink során az egér timocitákból, humán T limfocitákból, valamint Jurkat sejtekből származó membrán összetevők és citoplazmatikus komponensek átadásának hatékonyságát vizsgáltuk a különböző eredetű akceptor sejtek – egér vagy humán mezenchimális őssejtek – irányába. A transzportfolyamatok

vizsgálatához az előző fejezetben már említett kísérleteket végeztük el újra, de ez esetben fordított felállásban. Elsőként megjelöltük a donor sejtek plazmamembránját a PKH67 fluoreszcens membrán jelölő kit segítségével, majd szöveti őssejtek jelenlétében tenyésztettük őket 24 órán keresztül, következetesen 1:20 donor sejt – MSC arányt alkalmazva. A 24 órás ko-kultúrát követően analizáltuk a mezenchimális őssejteket áramlási citométer segítségével. A korábbi kísérleteinkhez hasonlóan most is izoláltunk mikrovezikulákat és exoszómákat mindhárom típusú sejt felülúszójából, majd membránjukat közvetlenül jelöltük a PKH67 festékkel. Ezt követően a jelöletlen egér, vagy humán szöveti őssejteket a fluoreszcens vezikulák jelenlétében tenyésztettük. Mivel azt tapasztaltuk, hogy az akceptor sejtek, jelen esetben a szöveti őssejtek PKH67 pozitivitása arányosan növekszik a hozzáadott extracelluláris vezikulák mennyiségének növelésével, számos EV/sejt arányt leteszteltünk. Az MSC-k dóziszfüggő PKH67 pozitívítását a **8. ábra** mutatja.

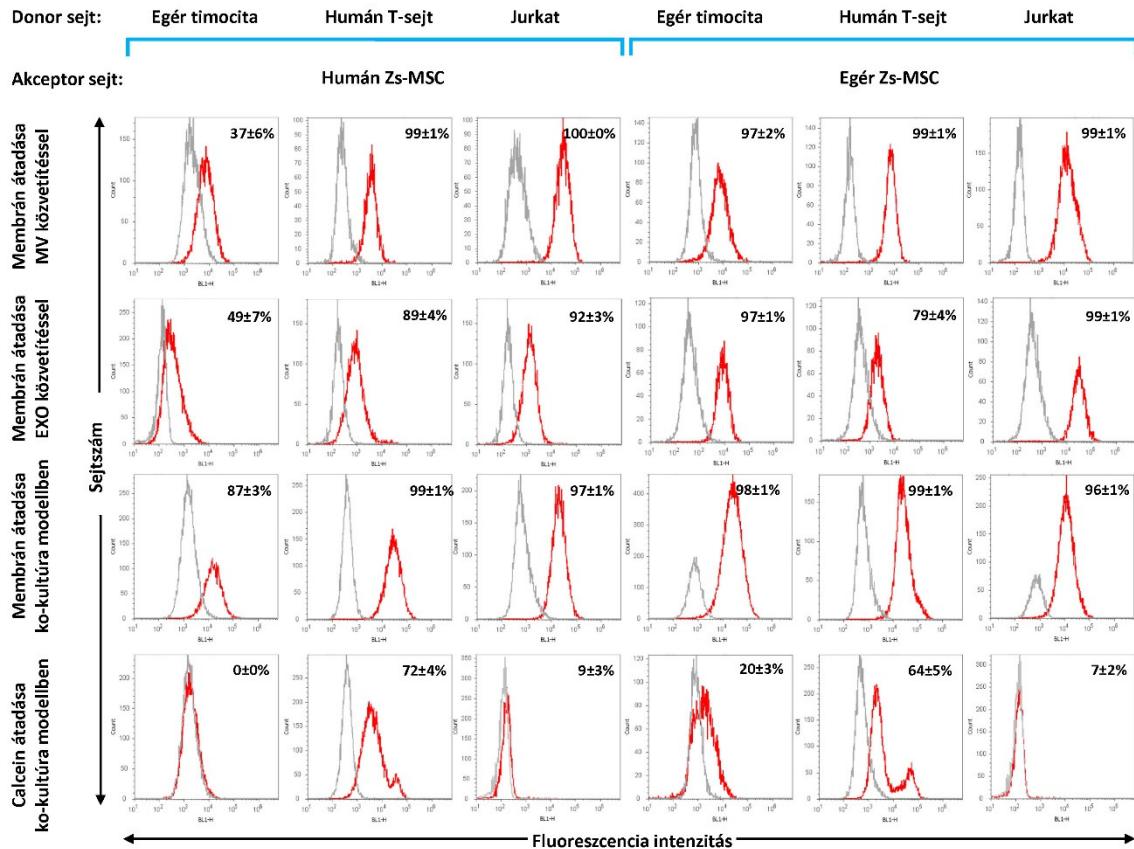


8. ábra: Humán zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek kezelése humán T limfocitákból, Jurkat sejtekből, valamint egér timocitákból származó mikrovezikulákkal és exoszómákkal többféle EV/sejt arányt alkalmazva (A) Humán Zs-MSC-k dóziszfüggő PKH67 pozitívítása különböző mennyiségű mikrovezikulával történő kezelés hatására. (B) Humán Zs-MSC-k dóziszfüggő PKH67 pozitívítása különböző mennyiségű exoszómával történő kezelés hatására. Az extracelluláris vezikulák koncentrációját az Izon qNano készülék segítségével állapítottuk meg, a kísérletek időtartama minden esetben 24 óra volt.

A dóziszfüggés ismeretében a kísérleteink során következetesen az alábbi EV/sejt arányok használatára törekedtünk: 6×10^4 MV/sejt, illetve 6×10^5 EXO/sejt átlagosan. A **7. és 9. ábrán** látható eredményeket egyaránt e koncentrációk használatával kaptuk.

A **9. ábrán** látható eredmények alapján (3. sor hisztogramjai) elmondható, hogy a 24 óráig tartó szoros sejt-sejt kapcsolatoknak köszönhetően mind az egér, mind a humán szöveti őssejtek nagy mennyiségű, donor sejt eredetű membrán komponenset akkumuláltak. Hasonlóképpen nagyfokú PKH67 pozitivitást tapasztaltunk 24 óra elteltével, amennyiben a fluoreszcens membrán festékkel jelölt mikrovezikulák vagy exoszómák jelenlétében tenyésztettük az egér vagy humán mezenchimális őssejteket (**9. ábra, 1. és 2. sor hisztogramjai**). Bizonyos esetekben azonban jelentős különbségeket tapasztaltunk az allogén és xenogén modellek között. A membránkomponensek átadása például sokkal kevésbé bizonyult hatékonynak egér timocitákról a humán őssejtek felé, mint egér MSC-k irányába. Bár ez a különbség a xenogén modellek esetében az MV és EXO közvetítés során egyaránt sokkal látványosabb volt, mint a közvetlen sejt-sejt kapcsolatokat biztosító ko-kultúra modellekben (**9. ábra, 1. oszlop hisztogramjai**) az allogén kísérleti rendszerekhez viszonyítva (**9. ábra, 4. oszlop hisztogramjai**).

A citoplazmatikus calcein mezenchimális őssejtek irányába történő átadásának vizsgálata során – amennyiben az egér timocitákat, humán T-sejteket vagy Jurkat sejteket jelöltük calcein-AM festékkel és tenyésztettük együtt szöveti őssejtekkel – azt tapasztaltuk, hogy a humán MSC-k irányába nem volt detektálható mértékű calcein átadás a timociták felől, ellenben az egér MSC-k közel 20%-a bizonyult pozitívnak 24 óra elteltével calceinre. Az egér és humán szöveti őssejtek közel azonos mennyiségű, humán T limfocitákból származó calceint akkumuláltak, ellenben a Jurkat limfóma sejtek felől sem a humán, sem pedig az egér szöveti őssejtek irányába nem volt megfigyelhető calcein transzport (**9. ábra, 4. sor hisztogramjai**).



9. ábra: Egér timocitákból, humán perifériás T limfocitákból és Jurkat sejtekből származó membrán komponensek és citoplazmatikus calcein átadásának vizsgálata a szöveti őssejtek irányába ko-kultúra modellben, mikrovezikulák vagy exoszómák közvetítésével. A méréseket áramlási citométer segítségével végeztük. Az első és második sor hisztogramjai a szöveti őssejtek pozitívitasát mutatják a PKH67 festékre 24 órás inkubációt követően, amely során a sejteket a 3 különböző donor sejtől származó, PKH67 membránjelölő festék segítségével megjelölt mikrovezikulák vagy exoszómák jelenlétében tenyésztettük. A harmadik sor hisztogramjai a jelöletlen MSC-k PKH67 pozitívitasát mutatják, miután 24 órán keresztül együtt tenyésztettük őket a PKH67 festék segítségével megjelölt timocitákkal, T-sejtekkel vagy Jurkat sejtekkel. A negyedik sor hisztogramjai a jelöletlen MSC-k pozitívitasát mutatják calceinre, miután 24 órán keresztül együtt tenyésztettük őket calcein-AM segítségével megjelölt timocitákkal, T-sejtekkel vagy Jurkat sejtekkel. Minden egyes hisztogram legalább három független kísérletsorozat eredményét mutatja be, a százalékban megadott értékek az akceptor sejt átlagos pozitívitasát jelzik.

Annak érdekében, hogy a már említett MDR1 és MRP membrán transzporter fehérjék működéséhez köthető calcein eltávolítást megakadályozzuk a sejtekből, a

donor sejteket minden esetben alávetettük egy 30 perces, 10 μ M végkoncentrációban alkalmazott verapamil kezelésnek még a ko-kultúra kísérletek megkezdése előtt.

A membrán komponensek és citoplazmatikus calcein átadásának vizsgálatára vonatkozó kísérletek összesített eredményeit az **3. és 4. táblázat** mutatja. Az áramlási citometriás vizsgálatok alapján 10%-nál alacsonyabbnak bizonyult expressziós szinteket, vagy a nagyon gyenge pozitivitást, amelyet fluoreszcens mikroszkóp segítségével nem sikerült igazolnunk, egy mínusz jel jelöli. A 10-33% közötti pozitivitást egy plusz, a 33-66% közötti pozitivitást két plusz, míg a nagyon erős PKH67 vagy calcein pozitivitást három plusz jel mutatja.

3. Táblázat: Membrán komponensek és citoplazmatikus calcein átadásának vizsgálata a mezenchimális őssejtekből és egér timociták, human perifériás T-sejtek és Jurkat sejtek irányába ko-kultúra modellben, mikrovezikulák vagy exoszómák közvetítésével.

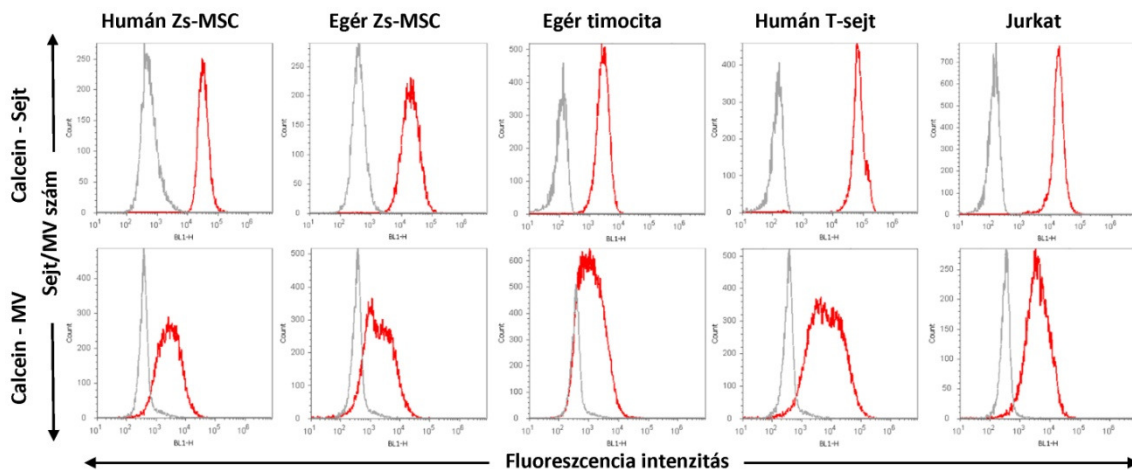
Donor sejt: Akceptor sejt:	Humán Zs-MSC			Egér Zs-MSC		
	Egér timocita	Humán T-sejt	Jurkat	Egér timocita	Humán T-sejt	Jurkat
Membrán transzfer MV közvetítéssel	-	-	-	-	-	-
Membrán transzfer EXO közvetítéssel	-	-	-	-	-	-
Membrán transzfer ko-kultúra modellben	-	-	-	-	-	-
Calcein transzfer ko-kultúra modellben	-	+++	-	-	+	-

4. Táblázat: Membrán komponensek és citoplazmatikus calcein átadásának vizsgálata és egér timocitákból, human perifériás T-sejtekből és Jurkat sejtekből mezenchimális őssejtekből irányába ko-kultúra modellben, mikrovezikulák vagy exoszómák közvetítésével.

Donor sejt: Akceptor cell:	Egér timocita		Humán T-sejt		Jurkat	
	Humán Zs-MSc	Egér Zs-MSc	Humán Zs-MSc	Egér Zs-MSc	Humán Zs-MSc	Egér Zs-MSc
Membrán transzfer MV közvetítéssel	++	+++	+++	+++	+++	+++
Membrán transzfer EXO közvetítéssel	++	+++	+++	+++	+++	+++
Membrán transzfer ko-kultúra modellben	+++	+++	+++	+++	+++	+++
Citoplazmatikus transzfer ko-kultúra modellben	-	+	+++	++	-	-

Az eddigi eredményeink alapján azt feltételeztük, hogy a plazmamembrán lefűződésével keletkező, T limfocita eredetű mikrovezikulák valamilyen szerepet játszanak a citoplazmatikus calcein átadásában is a szöveti őssejtek irányába, mivel a ko-kultúra modellekben és a T limfocita eredetű MV kezelések során egyaránt azt tapasztaltuk, hogy az MSC-k 24 óra elteltével nagy mennyiségű T-sejt eredetű membrán összetevőt halmoztak fel. A továbbiakban calcein AM festékkel jelöltük meg mind az 5 sejtféleséget, majd izoláltuk és megvizsgáltuk a mikrovezikula preparátumokat áramlási citométer segítségével. Függetlenül a sejt eredetétől és típusától, minden esetben magas pozitivitást mértünk az összes MV mintánk esetében (**10. ábra**). Viszont amennyiben T

limfocita eredetű, calceinre magas pozitivitást mutató mikrovezikulákkal kezeltünk szöveti összejtek, semmiféle pozitivitást nem tapasztaltunk calceinre nézve még 24 óra elteltével sem. Ennek fényében valószínűsíthető, hogy a mikrovezikulák által közvetített fluoreszcens calcein mennyisége nem elegendő ahhoz, hogy reprodukálja azt a magas pozitivitást, amelyet a ko-kultúra modellek esetében mértünk. Nagyon valószínűnek tűnik tehát, hogy valamilyen más mechanizmus tehető felelőssé a nagymértékű citoplazmatikus calcein átadásért, amely egyértelműen szoros sejt-sejt kapcsolatokat igényel. Ezt nagymértékben alátámasztani látszik az az eredményünk is, hogy míg a humán T limfociták láthatóan nem képesek szöveti összejt eredetű membrán összetevők felhalmozására, mégis óriási mennyiségű, mezenchimális összejt eredetű fluoreszcens calceint halmoznak fel ko-kultúra modell esetében.



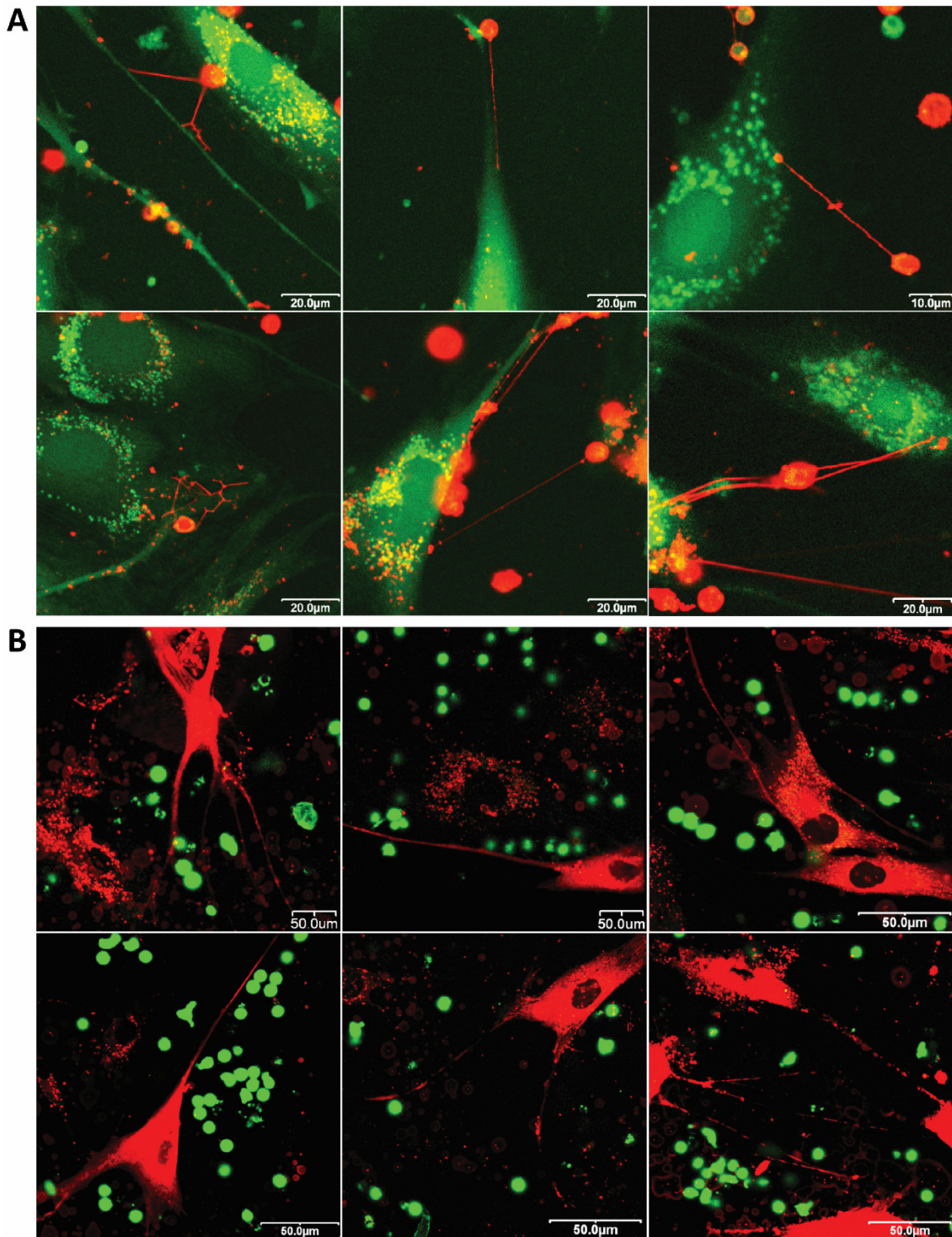
10. ábra: Egér és humán mezenchimális összejtek, egér timociták, humán T limfociták és Jurkat sejtek, valamint a megfelelő mikrovezikula izolátumok vizsgálata fluoreszcens calceinre nézve áramlási citométer segítségével.

4.2.4 Membrán nanocsövek vizsgálata zsír eredetű mezenchimális őssejtek és humán perifériás T limfociták között

Annak érdekében, hogy tisztázzuk, milyen mechanizmus(ok) tehető(k) felelőssé a rendkívül intenzív, kétirányú citoplazmatikus calcein transzportért a humán mezenchimális őssejtek és perifériás T-sejtek között, megvizsgáltuk a sejteket ko-kultúra modellben konfokális lézer pásztázó mikroszkóp segítségével és közvetlen sejt-sejt kapcsoló struktúrák után kutattunk. Amennyiben a szöveti őssejteket CellTracker CM-DiI fluoreszcens membrán festékkel, a T limfocitákat pedig calcein AM festékkel jelöltük, a 24 órás ko-kultúrát követően semmilyen, a szöveti őssejtekből származó és a két sejtfeleséget összekötő nanocső formációt nem észleltünk (**11. ábra B**). Viszont fordított esetben – amennyiben a T limfocitákat CellTracker CM-DiI fluoreszcens membrán festékkel, a szöveti őssejteket pedig calcein AM festékkel jelöltük – rengeteg membrán nanocső jelenlétére lettünk figyelmesek, amelyek a T limfociták és szöveti őssejtek közötti szoros kapcsolatot biztosították. Az eredményeink fényében kijelenthetjük, hogy ezek a membrán nanocsövek minden esetben a T limfocitákból származtak (**11. ábra A**).

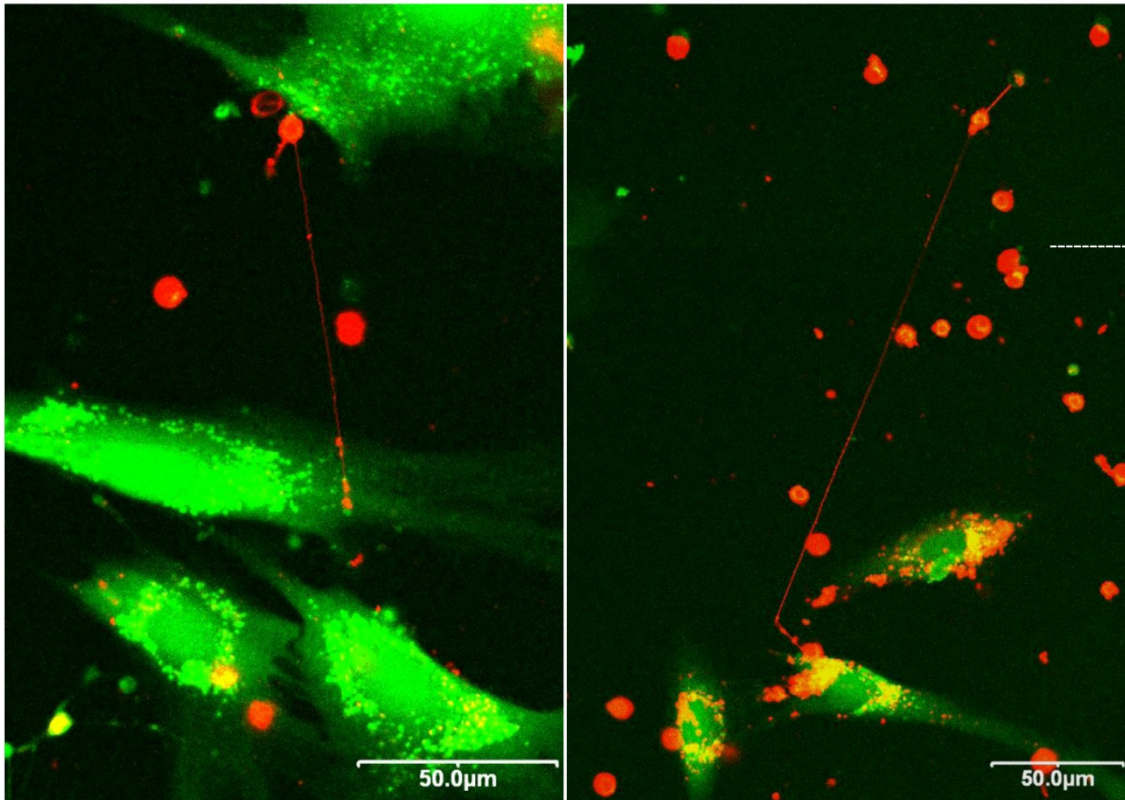
Ezek az ún. tunneling nanocsövek (TNT) meglehetősen gyorsan, a ko-kultúra második-harmadik órájában kialakultak és láthatóan több órán keresztül biztosították a stabil sejt-sejt összeköttetéseket. A T-sejtek calcein pozitívitasát három különböző időpontban is megvizsgáltuk: 4, 12 és 24 óra elteltével. 4 óra elteltével a sejtek csupán 1-2%-a volt calcein pozitív. 12 óra elteltével ez az arány már 40-50% volt, míg 24 óra elteltével szinte valamennyi T-sejt pozitívnak bizonyult a fluoreszcens calceinre.

Összességében elmondhatjuk, hogy a membrán nanocsövek nagyon gyorsan kialakultak a T-sejtek és az őssejtek között, viszont a mérhető mennyiségű citoplazmatikus calcein átadása már jóval időigényesebb folyamatnak bizonyult. A membrán nanocsövek kizárólag a T limfocitáktól származtak, és közülük némelyik hossza elérte a 200 μm hosszúságot is (**12. ábra**).



11. ábra: Humán mezenchimális őssejtek és perifériás T limfociták ko-kultúrájáról készült konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek (A) A T-sejteket CellTracker CM-DiI festékkel (narancssárga), míg a mezenchimális őssejteket calcein AM festékkel jelöltük (zöld). 24 órás inkubációt követően nagyon sok T-sejt eredetű membrán nanocső képződött a kétféle sejtípus között. Ugyanakkor a legtöbb szöveti őssejt plazmamembránjával nagy mennyiségű, T-sejt eredetű membrán vezikula fuzionált. (B) A mezenchimális őssejteket CellTracker CM-DiI

festékekkel (narancssárga), míg a T-limfocitákat calcein AM festékekkel jelöltük (zöld). Szöveti őssejt-eredetű membrán nanocsöveket, amelyek a T limfocitákkal közvetlen sejt-sejt kapcsolatot alakítottak volna ki, nem észleltünk.



12. ábra: Extrém hosszúságú membrán nanocsövekről készített konfokális lézer pásztázó mikroszkópos felvételek. *A bal oldali képen egy 85 µm hosszú, a jobb oldalin pedig egy 225 µm hosszúságú membrán nanocső látható. A jobb oldali fotó két különálló kép összeillesztésével készült, a képek határait a fehér színű pontozott vonal jelzi. A T-sejteket CellTracker CM-DiI festékekkel (narancssárga), míg a mezenchimális őssejteket calcein AM festékekkel jelöltük (zöld).*

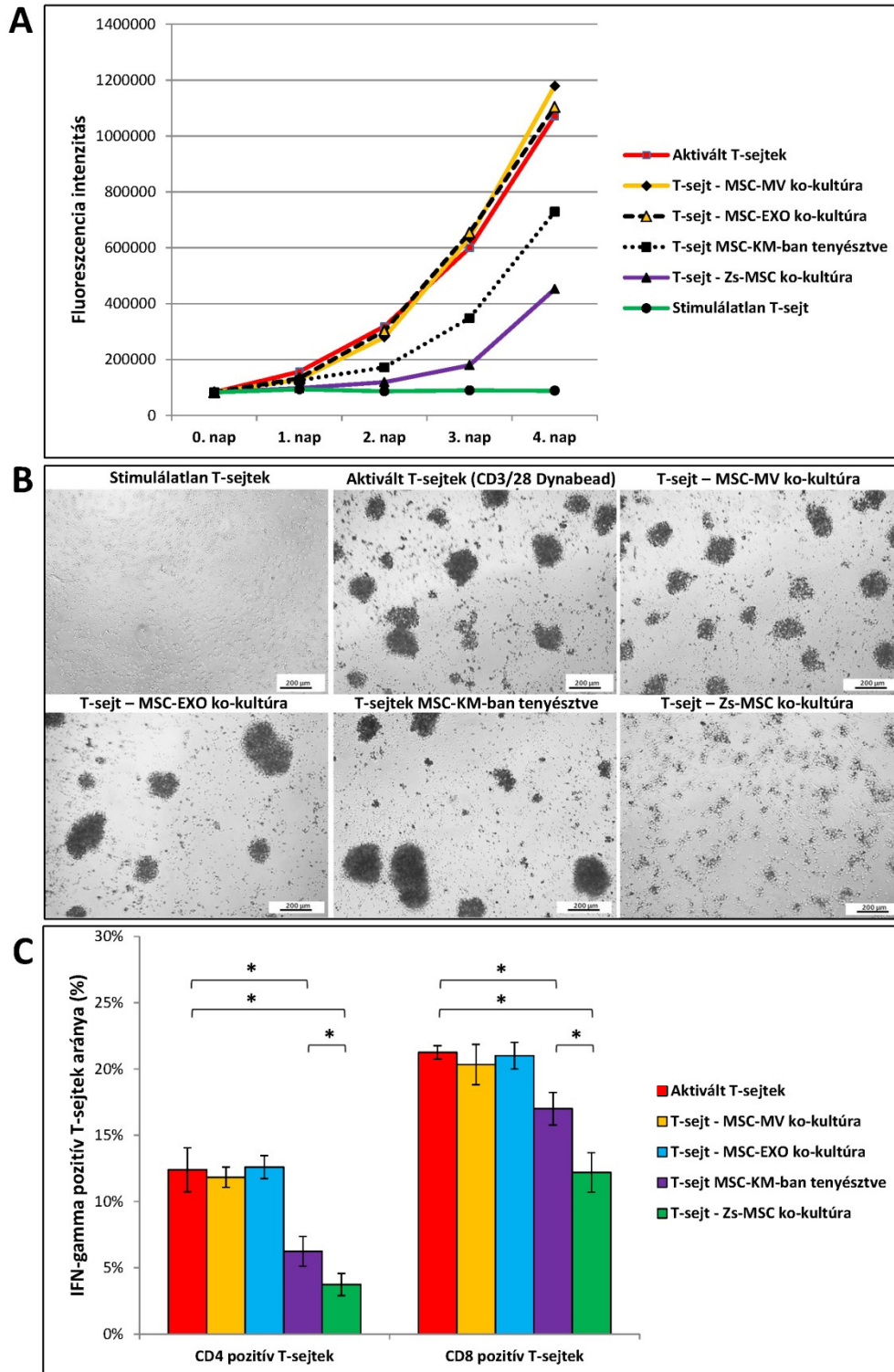
Fontos megjegyezni, hogy a Jurkat limfóma sejtek bár egymás között kialakítottak sejt-sejt kapcsolatokat membrán nanocsöveken keresztül, ám a szöveti őssejt irányába már nem képeztek ilyen jellegű struktúrákat a T-sejtes kísérletekkel megegyező körülmények között.

4.2.5 A mezenchimális őssejt-eredetű mikrovezikulák és exoszómák, parakrin faktorok valamint közvetlen sejt-sejt kapcsolatok immunszuppresszív hatása *in vitro* stimulált T limfociták esetében

Miután sikerült tisztáznunk, hogy milyen folyamatok tehetők felelőssé a membrán összetevők átadásáért az MSC-k és T limfociták között, funkcionális vizsgálatokat is elvégeztünk annak kiderítéséhez, hogy milyen módon befolyásolják az őssejt-eredetű mikrovezikulák és exoszómák az *in vitro* aktivált citotoxikus –és helper T limfociták osztódási képességét és gamma interferon (IFN- γ) termelését. Az egyes MSC-eredetű extracelluláris vezikula alpopulációk Jurkat limfóma sejtek osztódási képességére gyakorolt hatását a továbbiakban szintén teszteltük.

Az MSC-eredetű mikrovezikulák és exoszómák funkcionális hatásának vizsgálatához *in vitro* aktivált T limfocitákat tenyésztettünk együtt különböző mennyiségű mikrovezikulával vagy exoszómával, majd a T-sejtek osztódási képességét 4 napon keresztül nyomon követtük. Miután differenciál centrifugálás segítségével eltávolítottuk az összes extracelluláris vezikulát az MSC-k felülúszójából, a hígított vagy hígítatlan kondicionált médium proliferációra és IFN- γ termelésre gyakorolt hatását szintén teszteltük. Végül az MSC-k T-sejtekre és Jurkat sejtekre gyakorolt immunszuppresszív aktivitását közvetlen sejt-sejt kapcsolatok fennállása esetén, ko-kultúrában is megvizsgáltuk különböző MSC – T-sejt arányok mellett. A T limfociták aktiválásához humán T-Activator CD3/CD28 mikrogyöngyöket, vagy mitogén hatású lektint, concanavalin A-t (ConA) használtunk. A sejtproliferációs vizsgálatok során minden kísérletet kétféle módszer segítségével is elvégeztünk. A resazurin redukciós vizsgálatok és CFSE sejtproliferációs vizsgálatok során nagyon hasonló eredményeket kaptunk (**13. ábra**, **14. ábra**, **15. ábra**, **16. ábra**, **17. ábra**).

A CD3/CD28 mikrogyöngyök segítségével aktivált T limfociták osztódási sebességének változását MSC-EV-k hatására egyrészt resazurin redukciós vizsgálattal követtük nyomon, melynek eredményeit a **13. ábra A** szemlélteti. A 3. napon készült reprezentatív fénymikroszkópos felvételeket a **13. ábra B** mutatja. A mikrogyöngyök segítségével specifikusan aktivált T-sejtek osztódási sebességének változását egy másik módszer, a CFSE sejtproliferációs esszé segítségével is nyomon követtük, melynek eredményeit a **17. ábra A, B** mutatják. A concanavalin A segítségével stimulált



13. ábra: Mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű szolubilis mediátorok és extracelluláris vezikulák immunszuppresszív aktivitása – resazurin redukciós vizsgálatok. Az összehasonlító kísérletek során T-limfociták aktiválása minden esetben CD3/28 mikrogyöngyök segítségével történt. (A) Különböző tenyésztési körülmények között szaporított, aktivált T-limfociták növekedési görbéi. A resorufin fluoreszcencia intenzitása

arányos a sejtszámmal **(B)** Különböző tenyésztési körülmények között szaporított, aktivált T-limfocitákról készített reprezentatív fénymikroszkópos képek (3. nap) **(C)** Intracelluláris IFN- γ szint kvantitatív meghatározása immunfluoreszcencián alapuló áramlási citometriás analízist követően. A független kísérletek során mért értékek számtani átlagát ábráztuk a \pm standard szórásokat is feltüntetve. $P < 0.05$ érték esetén tekintettük a különbséget szignifikánsnak.

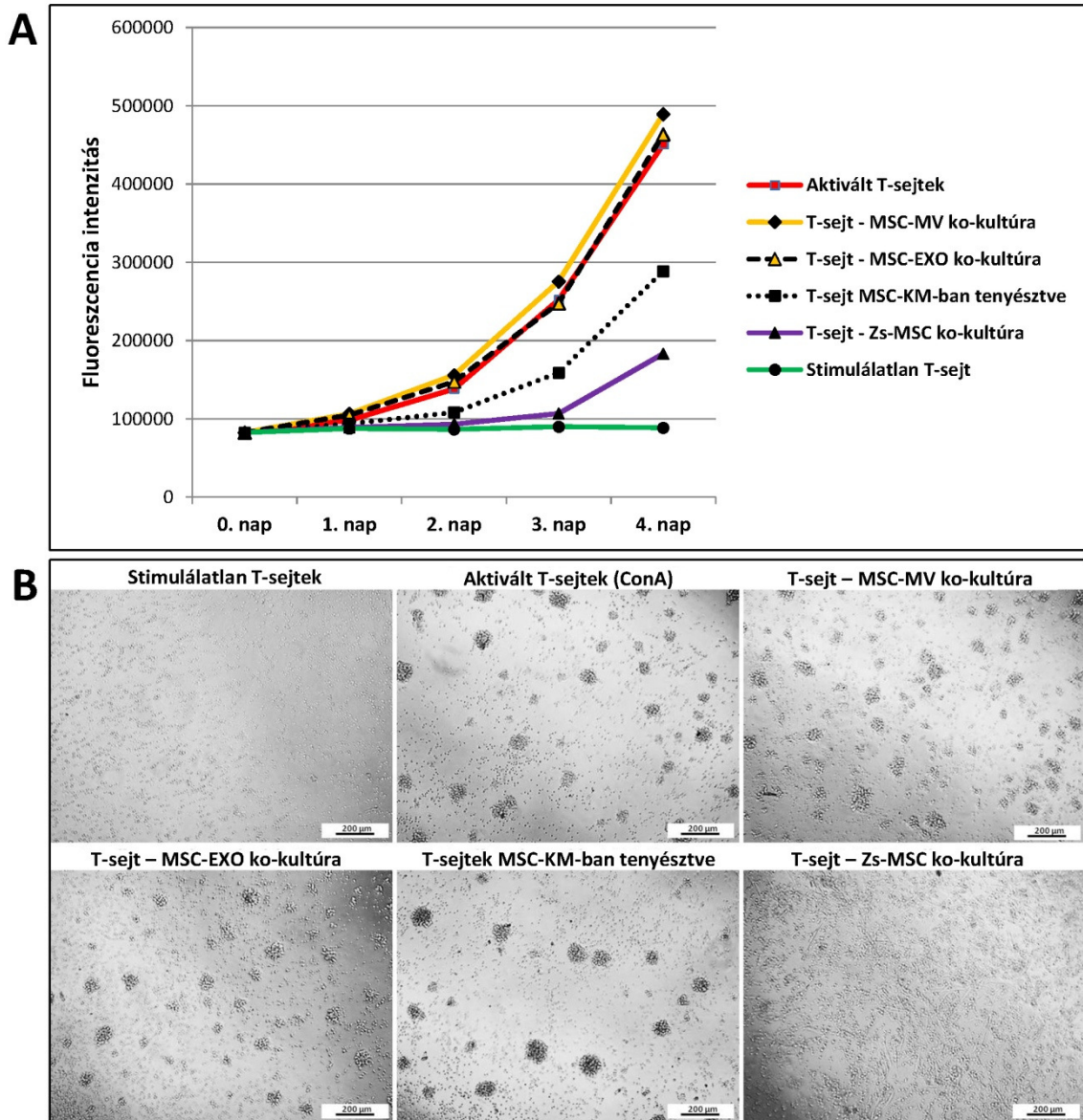
T limfociták osztódási sebességének változását MSC-EV kezelést követően resazurin redukciós vizsgálatok segítségével kvantifikáltuk (**14. ábra A, B**), és eredményeink alapján elmondható, hogy a mikrogyöngyökkel történő receptor-specifikus aktivációhoz képest nem tapasztaltunk érdemi különbséget.

Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák T limfociták osztódására gyakorolt hatását különböző koncentrációk alkalmazása mellett is megvizsgáltuk mind a mikrogyöngyök segítségével aktivált, mind pedig a ConA segítségével stimulált T-sejtek esetében. Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy sem az MSC-eredetű mikrovezikulák, sem pedig az exoszómák nem befolyásolják az aktivált T limfociták proliferációs rátáját még annak ellenére sem, hogy egyes esetekben óriási feleslegben voltak jelen a sejtek számához viszonyítva a 24 órás ko-kultúra során ($1,2 \times 10^5$ MV/sejt és $1,2 \times 10^6$ EXO/sejt átlagosan) (**15. ábra A; 16. ábra A**).

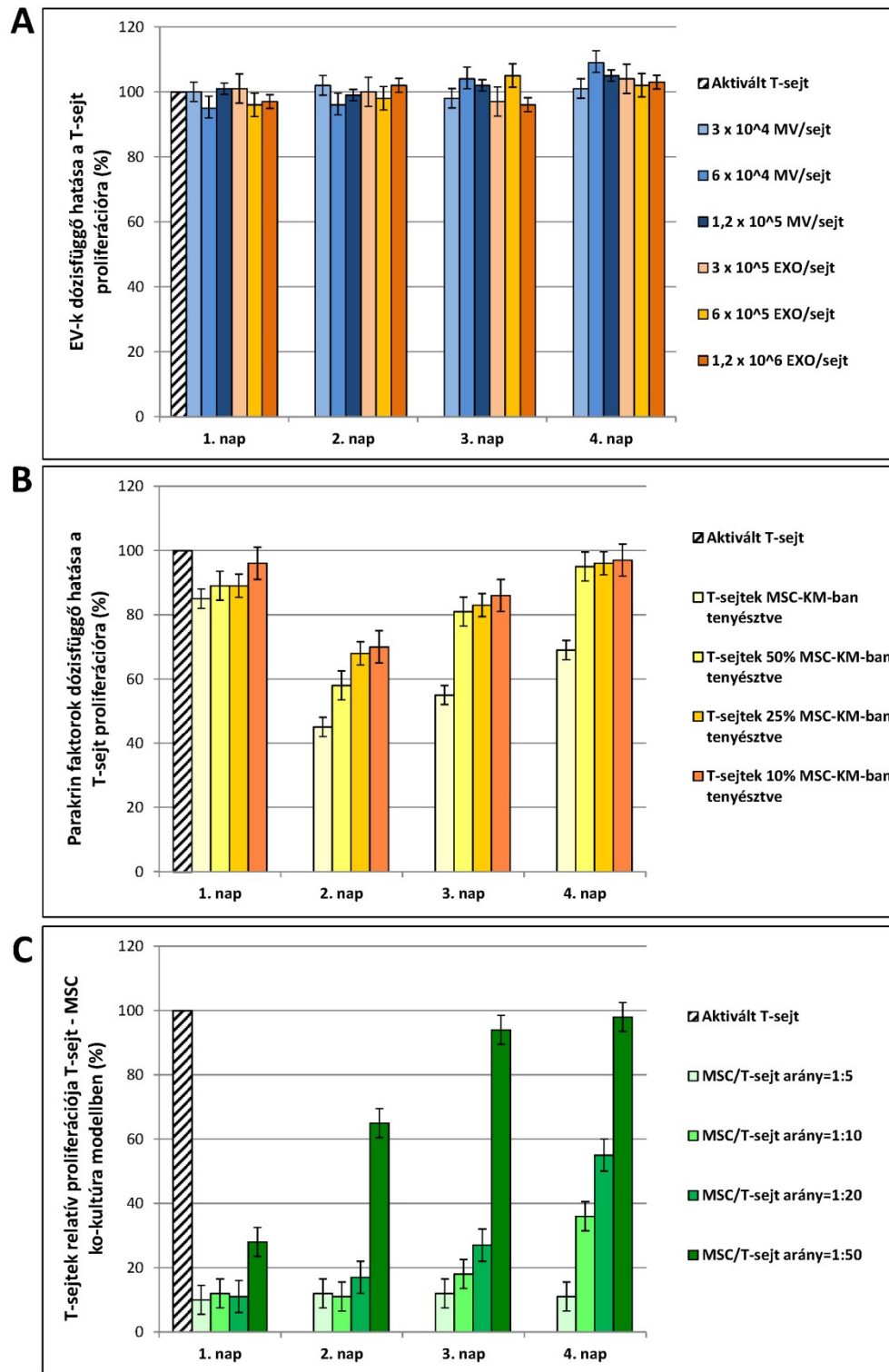
Ahogy az a korábbi kísérletek során már láthattuk, a mezenchimális őssejtek ezzel szemben tekintélyes mennyiségű, T limfocita eredetű extracelluláris vezikula felvételére voltak képesek (**9. ábra**), és a membránkomponensek felvételének mértéke határozott dóziszfüggést mutatott az extracelluláris vezikulák mennyiségével (**8. ábra C**). Ráadásul ezeknél a kísérleteknél a legmagasabb EV/sejt arány csupán a mostani mennyiségek fele volt, vagyis 6×10^4 MV/sejt és 6×10^5 EXO/sejt átlagosan.

A mezenchimális őssejt-kondicionált médiumban (MSC-KM) tenyésztett aktivált T limfociták osztódási sebességében statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott a kontroll aktivált T-sejtekhez képest, amelyeket normál sejttenyésztő médiumban szaporítottunk. A sejtek osztódási sebessége jelentősen mérséklődött függetlenül attól, hogy CD3/28 mikrogyöngyök (**13. ábra A, B**) vagy concanavalin A (**14. ábra A, B**) segítségével aktiváltuk vagy stimuláltuk a T limfocitákat. Amennyiben az MSC-kondicionált médiumból hígítási sort készítettünk és ezeket használtuk tenyésztő közegként az aktivált T-sejtek számára, egyre kisebb mértékű sejtosztódást gátló hatást tapasztaltunk (**15. ábra B, 16. ábra B**). A resazurin redukciós vizsgálatok

eredményeihez nagyon hasonló gátló hatást sikerült megfigyelni a CFSE sejtproliferációs esszé alkalmazásával is (17. ábra A, C).



14. ábra: Mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű szolubilis mediátorok és extracelluláris vezikulák immunszuppresszív aktivitása – resazurin redukciós vizsgálatok. Az összehasonlító kísérletek során a T-limfociták aktiválása minden esetben concanavalin A segítségével történt. (A) Különböző tenyésztési körülmények között szaporított, aktivált T-limfociták növekedési görbéi. A resorufin fluoreszcencia intenzitása arányos a sejtszámmal (B) Különböző tenyésztési körülmények között szaporított, aktivált T-limfocitákról készített reprezentatív fénymikroszkópos képek (3. nap)



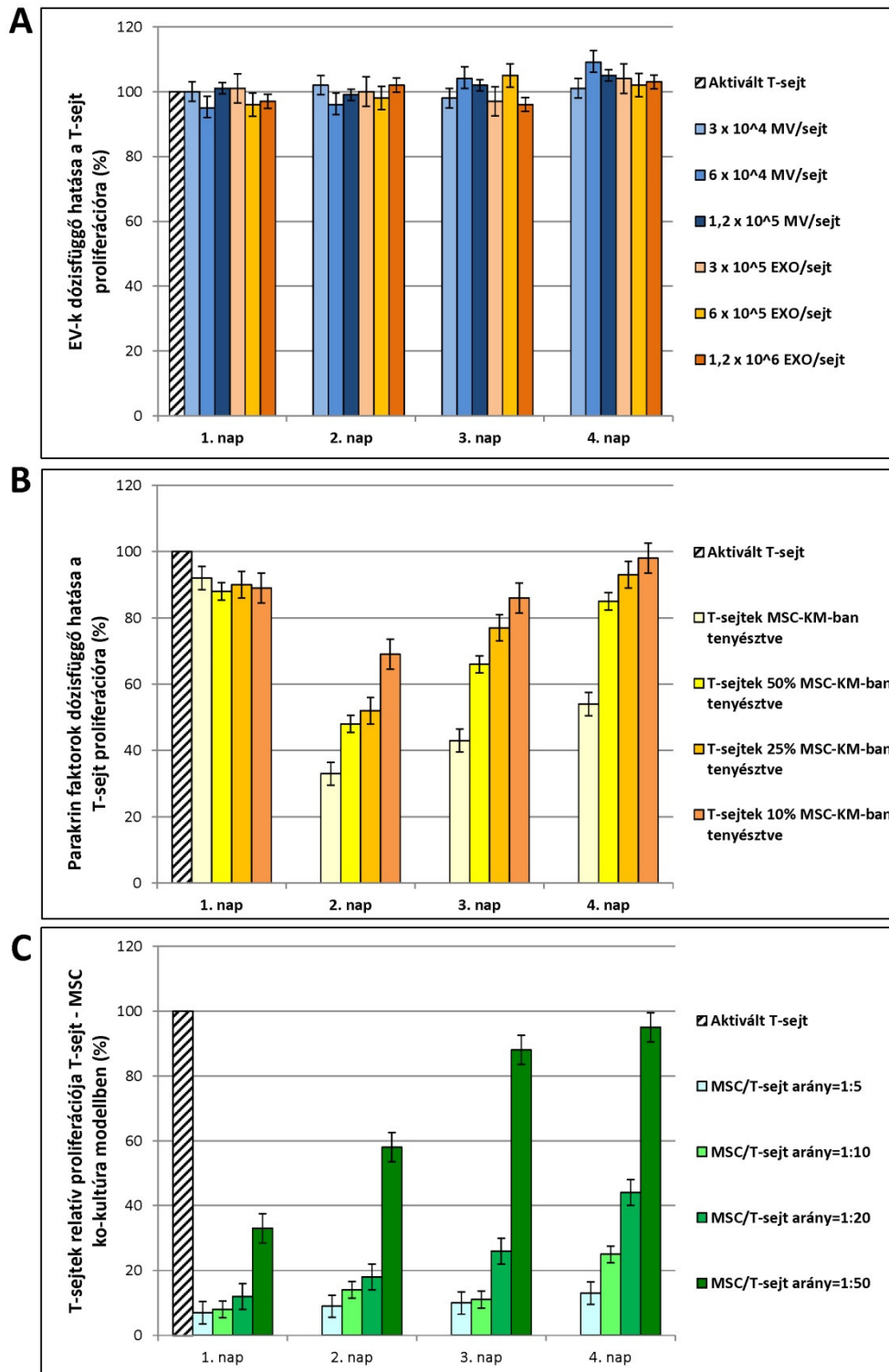
15. ábra: Mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű szolubilis mediátorok és extracelluláris vezikulák immunszuppresszív aktivitása – resazurin redukciós vizsgálatok. Az összehasonlító kísérletek során T-limfociták aktiválása minden esetben CD3/28 mikrogyöngyök segítségével történt. (A) MSC-EV-k dóziszfüggő hatása a T-sejt proliferációra (relatív proliferáció) (B) Az MSC-kondicionált médiumban lévő parakrin faktorok dóziszfüggő

hatása a T-sejt proliferációra (relatív proliferáció) (C) Aktivált T-sejtek relatív proliferációja ko-kultúra modellben különböző MSC – T-sejt arányok mellett.

A legjelentősebb sejtosztódást gátló hatás a ko-kultúra modellek esetében következett be függetlenül attól, hogy a T limfocitákat milyen módon aktiváltuk. Ezeknél a sejtes ko-kultúra modelleknél szintén különböző körülményeket alkalmaztunk a T-sejt aktiváció mechanizmusának, valamint az MSC – T-sejt arányok tekintetében. A korábbi kísérletekhez hasonlóan a receptor-specifikus aktiváció mellett (**13. ábra A, B**) a mitogénnel történő stimulációt is teszteltük (**14. ábra A, B**). Az 1:50 MSC – T-sejt arányok mellett a T limfociták osztódási sebességében elhanyagolható mértékű csökkenés volt megfigyelhető más sejtarányokhoz képest. Az MSC-k növekvő mennyiségével, 1:20, 1:10 és 1:5 sejtarányok mellett nagyon hasonló T-sejt proliferációt gátló hatást tapasztaltunk (**15. ábra C, 16. ábra C, 17. ábra A, D**).

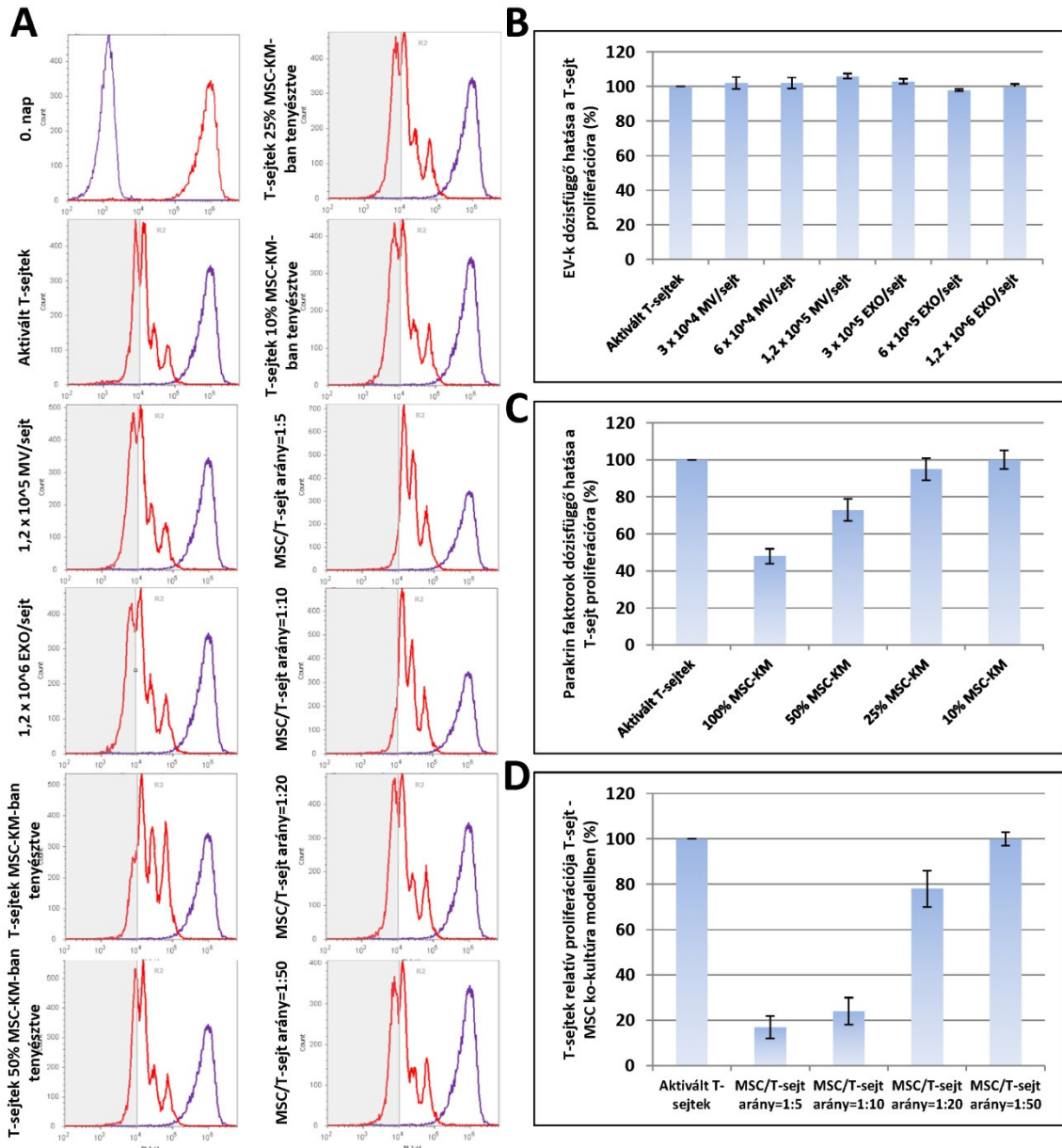
Fontos kiemelni, hogy 1:20 és 1:50 MSC – T-sejt arányok mellett a harmadik naptól az őssejtek intenzív pusztulása volt megfigyelhető. Valószínűleg a limfociták által termelt gyulladáscsökkentő citokinek tehetők felelőssé az MSC-k pusztulásáért, hiszen korábban már bebizonyosodott, hogy az erőteljes gyulladáscsökkentő körülmények autofágiát indukálnak és végeredményben apoptotikus sejthalált okoznak [88].

A mezenchimális őssejt-eredetű EV-k az aktivált T limfociták gamma interferon termelésére sem voltak semmilyen hatással (**13. ábra C**). Az MSC-kondicionált médium használatánál, illetve ko-kultúra modellek esetében viszont egyaránt jelentős csökkenést tapasztaltunk az IFN- γ termelésben. Érdekes módon a csökkenés mértéke viszont korántsem volt azonos mértékű, hiszen a ko-kultúra modelleknél a gátlás mértékében statisztikailag szignifikáns különbség mutatkozott az MSC-kondicionált médium használata esetén kapott eredményekhez képest. Valószínűsíthetően a membrán nanocsöveken keresztül történő intenzív citoplazmatikus anyagátadás okozhatja ezt a különbséget.



16. ábra: Mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű szolubilis mediátorok és extracelluláris vezikulák immunszuppresszív aktivitása – resazurin redukciós vizsgálatok. Az összehasonlító kísérletek során a T-limfociták aktiválása minden esetben concanavalin A segítségével történt. (A) MSC-EV-k dózisfüggő hatása a T-sejt proliferációra (relatív proliferáció)(B) Az MSC-kondicionált médiumban lévő parakrin faktorok dózisfüggő hatása a

T-sejt proliferációra (relatív proliferáció) (C) Aktivált *T*-sejtek relatív proliferációja ko-kultúra modellben különböző MSC – *T*-sejt arányok mellett



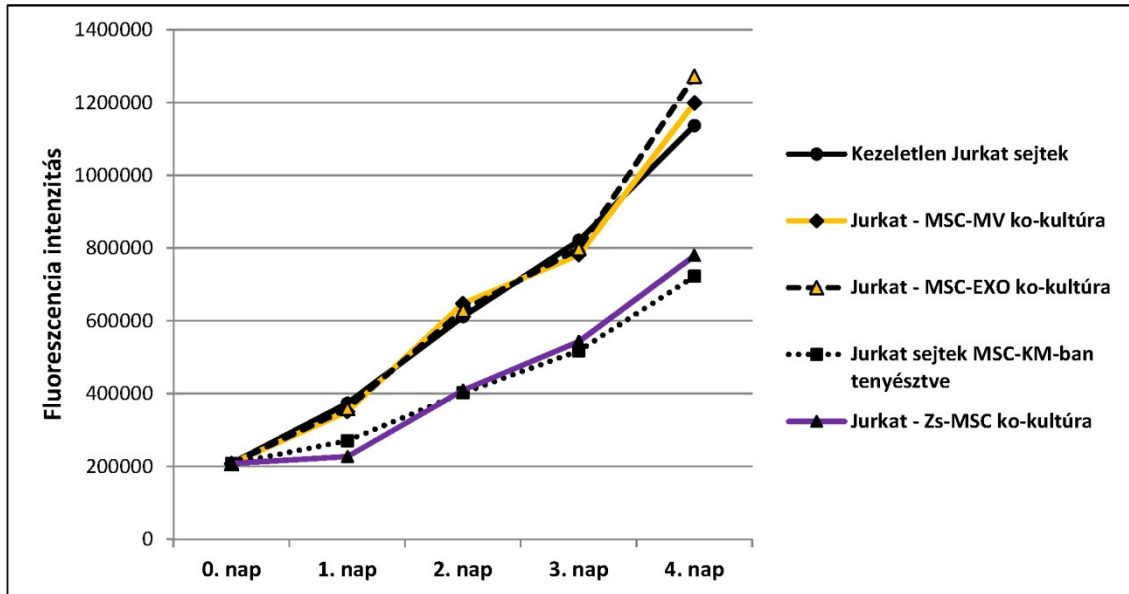
17. ábra: Mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű szolubilis mediátorok és extracelluláris vezikulák immunszuppresszív aktivitása – CFSE sejtproliferációs vizsgálatok. Az összehasonlító kísérletek során a *T*-limfociták aktiválása minden esetben CD3/28 mikrogyöngyök segítségével történt. (A) Különböző tenyésztési körülmények között szaporított, aktivált *T*-limfociták CFSE intenzitása. A reprezentatív sűrűségfelhő-képek a 4. napon készültek. A sejtszódás mértékét a legalább 4 osztódási cikluson keresztülment élő *T*-limfociták százalékos értékét figyelembe véve határoztuk meg a teljes populációhoz képest (B) MSC-EV-k dózisfüggő hatása a *T*-sejt proliferációra (relatív proliferáció) (C) Az MSC-

kondicionált médiumban lévő parakrin faktorok dózisfüggő hatása a T-sejt proliferációra (relatív proliferáció) (D) Aktivált T-sejtek relatív proliferációja ko-kultúra modellben különböző MSC – T-sejt arányok mellett

A gamma interferon szint csökkenése a CD4+ limfociták esetében jelentősebb volt, mint a citotoxikus T-sejtek esetében, függetlenül attól, hogy MSC-kondicionált médiumot használtunk a szaporításukhoz vagy együtt tenyésztettük őket mezenchimális őssejtekkel. Észlelhető mértékű IFN- γ termelést természetesen csak abban az esetben tapasztaltunk, ha a T-sejteket specifikusan aktiváltuk CD3/28 mikrogyöngyök segítségével. A ConA mitogénnel történő aktiváció során 24 óra elteltével nem tapasztaltunk gamma interferon termelést.

4.2.6 A mezenchimális őssejt-eredetű mikrovezikulák és exoszómák, parakrin faktorok valamint közvetlen sejt-sejt kapcsolatok sejtosztódást gátló hatása Jurkat limfóma sejtek esetében

Annak érdekében, hogy kiderítsük, van-e valamilyen sejtosztódást gátló hatása a mezenchimális őssejt-eredetű extracelluláris vezikuláknak a Jurkat limfoblasztoid sejtek esetében, frissen izolált mikrovezikulákkal ill. exoszómákkal kezeltük a Jurkat tenyészeteket. Ezeknél a kísérleteknél következetesen 3×10^4 MV/sejt, illetve 3×10^5 EXO/sejt arányokat alkalmaztunk, a ko-kultúra modell esetében pedig rendre 1:10 MSC – Jurkat sejtarányokat vizsgáltunk a limfóma sejtek igen erőteljes proliferációs képessége miatt. Miután az összes EV-t eltávolítottuk az MSC-k felülúszójából, a kondicionált médium Jurkat sejtek osztódására gyakorolt hatását is teszteltük. Ezeknél a kísérleteknél semmilyen módon nem aktiváltuk a Jurkat sejteket, concanavalin A mitogént sem használtunk.



18. ábra: Mezenchimális őssejtek, MSC-eredetű szolubilis mediátorok és extracelluláris vezikulák sejtosztódást gátló hatása – resazurin redukciós vizsgálatok. *Különböző tenyésztési körülmények között szaporított Jurkat limfóma sejtek növekedési görbéi. A resorufin fluoreszcencia intenzitása arányos a sejt számmal.*

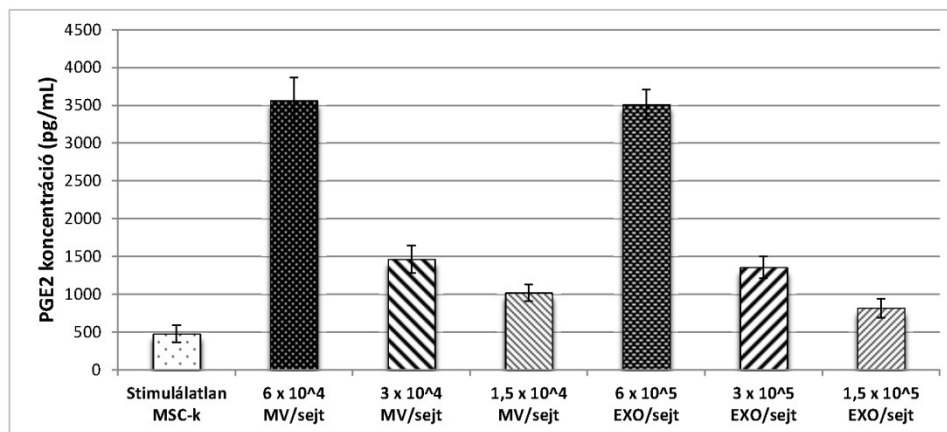
A **18. ábrán** látható eredmények alapján elmondhatjuk, hogy egyik MSC-eredetű EV frakció sem volt képes gátolni a sejtosztódást, viszont az MSC-kondicionált médium használatakor és a ko-kultúrák esetében is jelentős csökkenést észleltünk a sejtek osztódási sebességében. Fontos különbséget tapasztaltunk viszont a T-sejtes kísérletekhez képest, ugyanis a közvetlen sejt-sejt kapcsolatok a ko-kultúra modellek esetében nem okoztak nagyobb mértékű sejtosztódást gátló hatást az MSC-KM használatához képest. Valószínűsíthetően a membrán nanocsöveken keresztül történő, intenzív citoplazmatikus anyagátadás hiányára vezethető vissza ez a különbség, hiszen a mezenchimális őssejtek és Jurkat limfóma sejtek között egyszer sem sikerült kimutatnunk a citoplazmatikus anyagok fokozott átadását.

4.2.7 A T limfocita-eredetű mikrovezikulák és exoszómák gátló hatása a mezenchimális őssejtek prostaglandin E₂ termelésére

A továbbiakban megvizsgáltuk, hogy a T limfociták által termelt extracelluláris vezikulák hatást gyakorolnak –e a mezenchimális őssejtek prostaglandin E₂ termelésére.

A prosztoglandin E₂ az egyik legmeghatározóbb immunszuppresszív vegyület, amelyet az MSC-k termelnek válaszul a különféle gyulladási ingerekre. A Foxp3⁺ regulátor T sejtek indukcióján kívül gátolja az NK sejtek effektor funkcióit, a dendritikus sejtek érését, valamint hatására a makrofágok fenotípusa is eltolódik az M2, tehát gyulladásgátló fenotípus irányába.

A humán zsírszövet eredetű mezenchimális őssejteket különböző mennyiségű, aktivált T limfocita-eredetű mikrovezikula vagy exoszóma jelenlétében tenyésztettünk, majd 48 óra elteltével megmértük az MSC-felülúszó PGE₂ tartalmát prostaglandin E₂ immunoassay segítségével (**19. ábra**). A T limfocitákat előzetesen receptor-specifikusan aktiváltuk anti-CD3/28-konjugált mikrogyöngyök segítségével. Az eredményeink azt mutatták, hogy az aktivált T sejtekből származó mikrovezikulák és exoszómák egyaránt nagyon erőteljes PGE₂ szekréciót indukáltak az őssejtekben, méghozzá dóziszfüggő mértékben.



19. ábra: Zs-MSK-k felülúszójában mért prostaglandin E₂ koncentráció EV kezelést követően. A szöveti őssejteket 48 óráig tenyésztettük különböző mennyiségű, aktivált T-sejt-eredetű mikrovezikulák vagy exoszómák jelenlétében. A T-limfociták aktiválása minden esetben CD3/28 mikrogyöngyök segítségével történt.

4.3 Immortalizált mezenchimális őssejtvonalak vizsgálata

Munkánk során különböző módon immortalizált, zsírszövetből származó humán mezenchimális őssejtvonalakat vizsgáltunk. Az immortalizáló gének bevitelét lentivirális génbeviteli rendszer segítségével valósítottuk meg az Anyagok és módszerek fejezetben leírtak szerint. A további vizsgálatok és kísérletek célja annak megállapítása volt, hogy az immortalizációt követően ezek a felnőtt szöveti őssejtvonalak valóban megfelelnek-e a mezenchimális őssejtekkel szemben támasztott követelményeknek, megtartották-e differenciációs képességüket illetve megőrizték-e genomi stabilitásukat.

4.3.1 Immortalizált sejtvonalak létrehozása

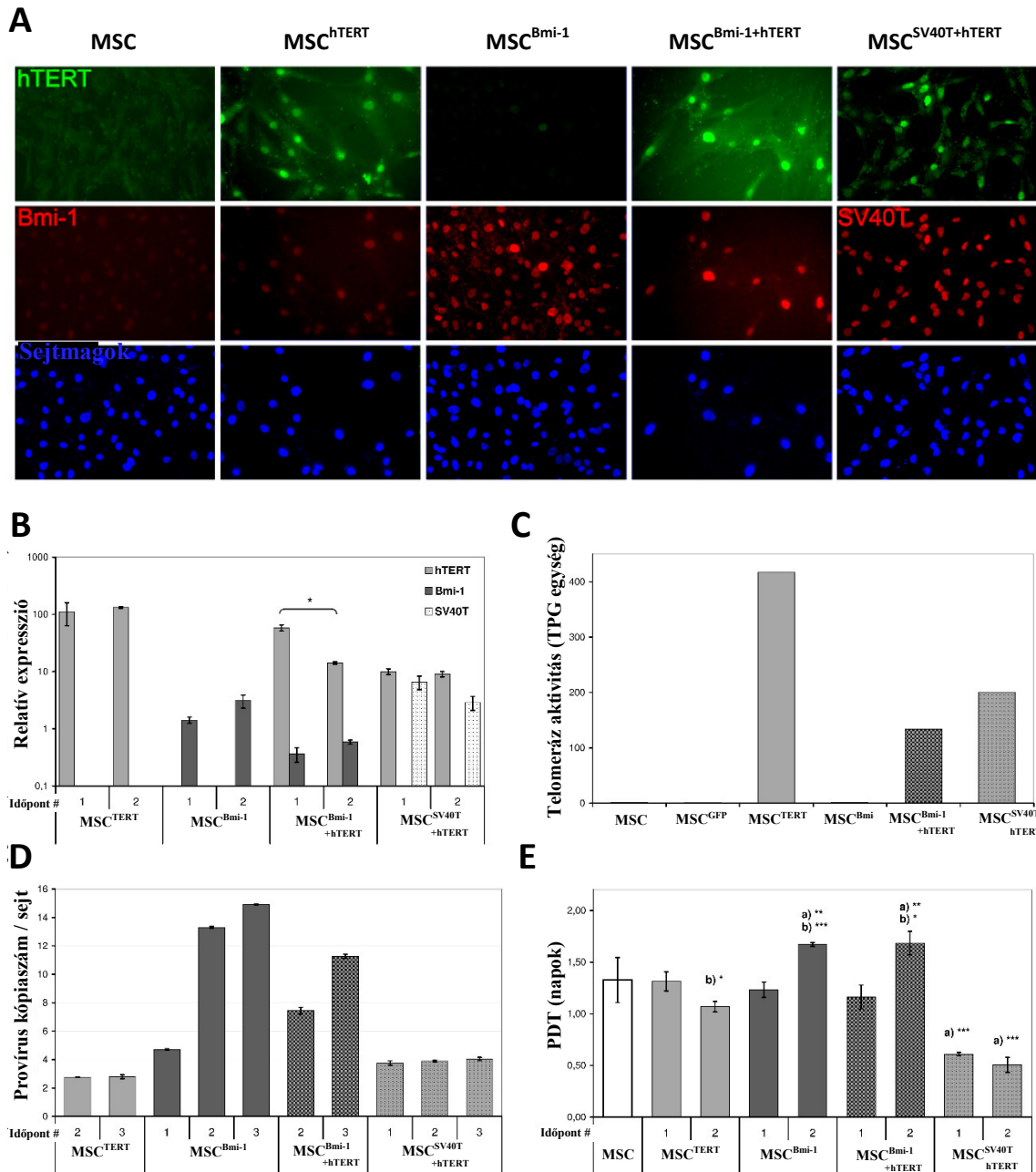
A lentivirális transzdukciót követően az egyes zsírszövet eredetű MSC sejtvonalakat összesen több mint 20 hónapon keresztül szaporítottuk. A Bmi-1 gén bevitelének segítségével immortalizált őssejtek az 55. és 60. populációkettőződés közötti időszakban befejezték a sejtosztódást és a szenescencia állapotába kerültek. Az összes többi sejtvonal esetében még nagyon sokáig aktív sejtosztódást figyeltünk meg. A különböző vizsgálatok, mérések pontos időpontjait – mindegyik sejtvonal esetében az aktuális populációkettőződés értékét megjelölve – az **5. táblázat** tartalmazza.

4.3.2 Az immortalizáló gének expressziós szintjének meghatározása

A különböző immortalizáló gének hatékony kifejeződését többféle módszer segítségével igazoltuk: kvantitatív PCR vizsgálattal, telomeráz enzimaktivitás méréssel valamint a keletkezett géntermékek immuncitokémiai festésével **20. ábra A-C**). A $Z\text{-MSC}^{\text{h-TERT}}$, $Z\text{-MSC}^{\text{Bmi-1+hTERT}}$, és $Z\text{-MSC}^{\text{SV40T+hTERT}}$ immortalizált sejtvonalak esetében sikerrel mutattuk ki a hTERT fehérjét kódoló mRNS jelenlétét valós idejű PCR reakció segítségével, valamint a fehérje jelenlétét és működőképességét is igazoltuk immuncitokémiai vizsgálat, valamint a telomeráz aktivitás mérésének segítségével.

5. táblázat: Az immortalizált őssejtvonalak jellemzéséhez használt különböző vizsgálatok típusainak, illetve a mérések pontos időpontjainak ismertetése.

Kísérlet típusa	Populációkettőződés (PD) száma a kísérlet időpontjában			
	Zs-MSCH ^{hTERT}	Zs-MSCB ^{Bmi-1}	Zs-MSCB ^{Bmi-1+hTERT}	Zs-MSCS ^{SV40T+hTERT}
Immunfluoreszcencia	83	33	107	108
RT-qPCR				
1. Kísérleti időpont	45	10	35	120
2. Kísérleti időpont	100	55	90	310
Provírus kópiaszámának meghatározása				
1. Kísérleti időpont	-	2	-	10
2. Kísérleti időpont	23	25	23	87
3. Kísérleti időpont	103	56	90	312
Telomeráz aktivitás mérése	84	26	104	350
Proliferációs vizsgálat				
1. Kísérleti időpont	19	20	19	74
2. Kísérleti időpont	102	32	107	424
SA-βGal festés	100	57	103	357
Áramlási citometria				
MSC markerek	86	29	109	370
Hematopoetikus markerek	50	42	50	176
Csont irányú differenciáció				
Alizarin vörös festés	50	42	50	176
RUNX2 & ALP	88	27	74	259
Zsír irányú differenciáció	98	27	74	280
Kariotípus meghatározása	56	-	56	183
In vivo tumorképző képesség vizsgálata	74	-	74	255
Megfigyelési periódus vége	120	Szeneszcencia 55-60 PD között	143	481



20. ábra Immortalizált MSC sejtvonalak karakterizálása. (A) Az immortalizáló géntermékek kimutatása immuncitokémiai jelöléssel. (B) Az immortalizáló gének relatív mRNA expressziós szintjei az endogén b-aktin szintjéhez viszonyítva, két különböző időpontban mérve. ($P=0.01$) (C) Telomeráz aktivitás mérése TRAPeze assay segítségével. (D) Sejtenkénti átlagos provírus kópiaszám meghatározása kvantitatív PCR segítségével, két vagy három különböző időpontban mérve, az Rnase P expressziós szintjéhez viszonyítva. (E) A populáció-kettőződéshez szükséges átlagos időtartam (PDT) meghatározása rezaurin redukciós vizsgálat segítségével, két különböző időpontban elvégezve. (a) Különbség a vad típusú Z-MSc-hez képest; (b) A két különböző időpont közötti eltérés. * $0.05 > P > 0.01$ ** $0.01 > P > 0.001$ *** $P < 0.001$. Az egyes

mérési eredményeket a 2. táblázatban megjelölt időpontban végeztük el (populáció-kettőzések száma).

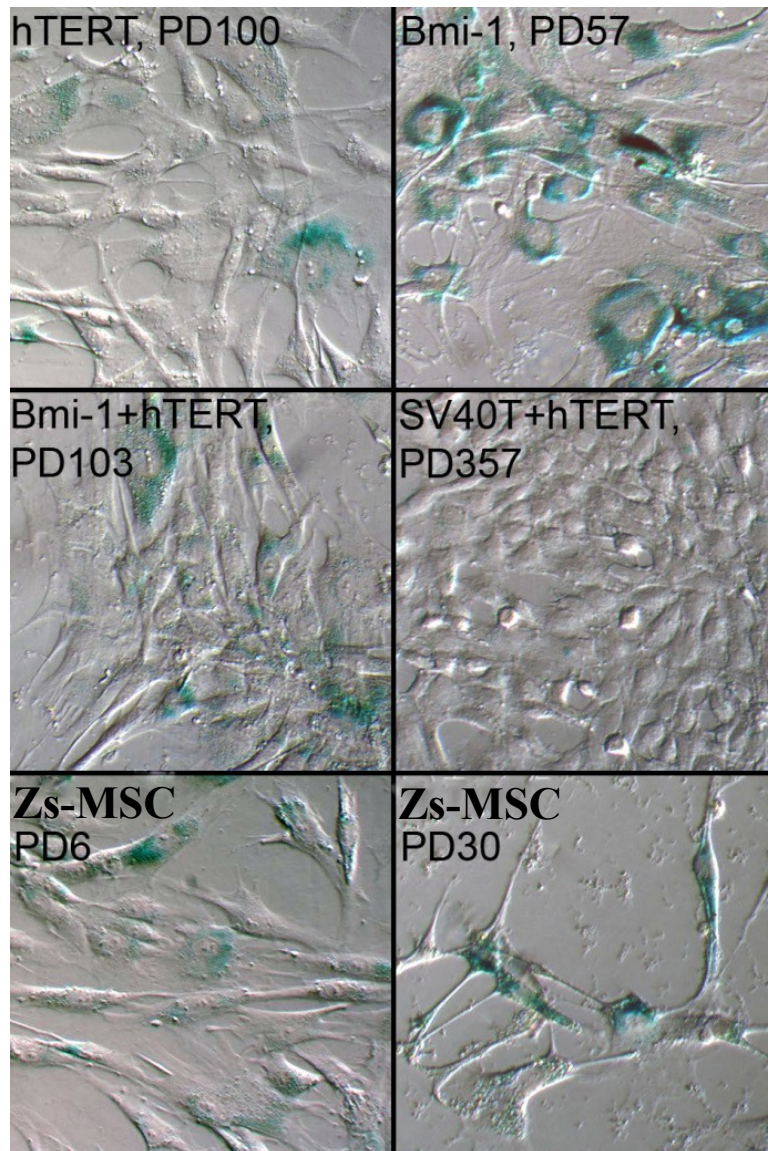
A vad típusú Zs-*MSC*, valamint a Zs-*MSC*^{Bmi-1} és Zs-*MSC*^{GFP} sejtvonalak esetében sem mRNS, sem pedig fehérje szinten nem sikerült kimutatnunk a hTERT jelenlétét. A Bmi-1 transzgént nem kifejező sejtelnél csak egy nagyon alacsony Bmi-1 fehérje expressziót sikerült kimutatnunk egy nem fajspecifikus ellenanyag segítségével, ellentétben a Zs-*MSC*^{Bmi-1} és Zs-*MSC*^{Bmi-1+hTERT} sejtvonallakkal, ahol egy nagyon erős overexpressziót figyeltünk meg mind mRNS, mind pedig fehérje szinten. Az SV40T mRNS és fehérje szintű expressziója természetesen csak a Zs-*MSC*^{SV40T+hTERT} sejtvonalnál volt megfigyelhető. Az exogén eredetű hTERT expressziója az idő előrehaladtával állandó mértékű maradt Zs-*MSC*^{hTERT} és Z-*MSC*^{SV40T+hTERT} sejtek esetében, viszont a Zs-*MSC*^{Bmi-1+hTERT} sejtvonalnál egy 4,1-szeres csökkenést mértünk (P=0.01) a 35. és 90. populációkettőződés közötti időszakban. Amíg a passzázsszám növekedésével az SV40T antigén enyhe csendesítését figyeltük meg a Z-*MSC*^{SV40T+hTERT} sejtekben, addig a Bmi-1 fehérjét kódoló mRNS mennyiségének kismértékű növekedését mutattuk ki mind a Zs-*MSC*^{Bmi-1}, mind pedig a Zs-*MSC*^{Bmi-1+hTERT} sejtvonalak esetében. Mindazonáltal ezek a kismértékű különbségek statisztikailag nem bizonyultak szignifikánsnak.

4.3.3 Provírus kópiaszámának meghatározása

A sejtenkénti átlagos, genomba integrálódott provírus kópiaszámot valós idejű PCR reakciók segítségével határoztuk meg (**20. ábra D**). Mind a korai, mind pedig a későbbi időpontban elvégzett mérések alapján a Zs-*MSC*^{hTERT} sejtek legnagyobb hányada átlagosan három kópia integrálódott provírust tartalmazott, míg a Zs-*MSC*^{SV40T+hTERT} sejtvonala esetében egy kópia SV40T és három kópia hTERT transzgént kódoló virális szekvenciát sikerült kimutatnunk. Ebben az esetben a hTERT és SV40T géneket kódoló provírus kópiaszám gyorsan stabilizálódott a populációban és változatlan maradt az idő előrehaladtával. Ezzel ellentétben a magasabb kópiaszámú Bmi-1 transzgént hordozó klónok fokozatos szelekcióját figyeltük meg a Zs-*MSC*^{Bmi-1} (5-15 kópia) és Zs-*MSC*^{Bmi-1+hTERT} (8-12 kópia) sejtvonalak esetében egyaránt.

4.3.4 Proliferációs -és sejtöregedés vizsgálatok

A populációkettőződés időtartamának (PDT) értékeit a logaritmusos növekedés középső szakaszában lévő, úgynevezett midlog fázisban lévő populációk esetében határoztuk meg (**20. ábra E**). A kezdeti időszakban a $Zs\text{-}MSC^{h\text{-}TERT}$, $Zs\text{-}MSC^{Bmi\text{-}1}$ és $Zs\text{-}MSC^{Bmi\text{-}1+h\text{-}TERT}$ sejtvonalak esetében a populációkettőződés időtartamát tekintve nem találtunk jelentős különbséget a korai passzázsszámú parentális, vagyis vad típusú $Zs\text{-}MSC$ -hez viszonyítva. Ezzel ellentétben a $Zs\text{-}MSC^{SV40T+h\text{-}TERT}$ sejtvonala esetében már a korai mérések során is kétszeres osztódási sebességet mértünk a vad típusú sejtekhez képest.

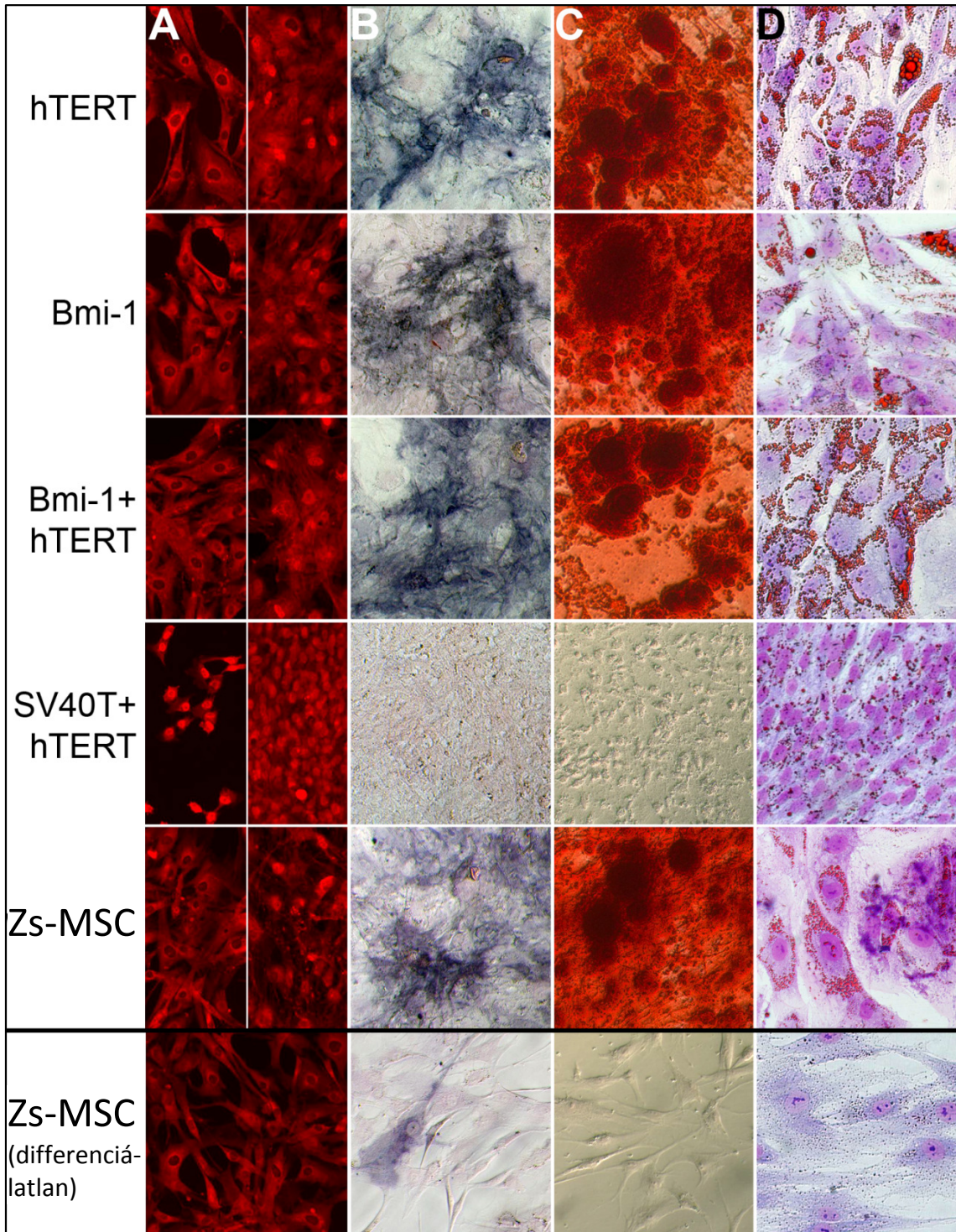


21. ábra Szeneszencia-asszociált β -galaktozidáz festés

A Bmi-1 transzgént kifejező őssejtek növekedése a 32. populációkettőződést elérve lelassult, majd az 55-60. PD közötti időszakban a sejtek osztódása leállt. A Bmi-1 és hTERT transzgéneket egyaránt kifejező sejtek növekedési üteme idővel szintén csökkent, viszont az osztódásuk a későbbiekben is stabilan folytatódott. A $Zs-MSC^{hTERT}$ és $Zs-MSC^{SV40T+hTERT}$ sejtvonalak osztódási sebessége ellenben kismértékű növekedést mutatott a további szaporítás során. A szenescencia-asszociált β -galaktozidáz festés során azt tapasztaltuk, hogy a hTERT gént kifejező sejtek a 100. populációkettőződés után, a Bmi-1 és hTERT géneket együttesen kifejező sejtek pedig a 103. populációkettőződést követően sem mutattak eltérést a fiatal, vad típusú őssejtekhez képest. Az önmagában csak a Bmi-1 gént kifejező sejtek többsége az 57. kettőződésnél már teljes tehát szenescenciát mutatott ellentétben a $Zs-MSC^{SV40T+hTERT}$ sejtvonallal, ahol a sejtek teljesen negatív festődést mutattak még a 357 populációkettőződési ciklusban is (**21. ábra**).

4.3.5 Sejtfelszíni antigének és differenciációs képesség vizsgálata

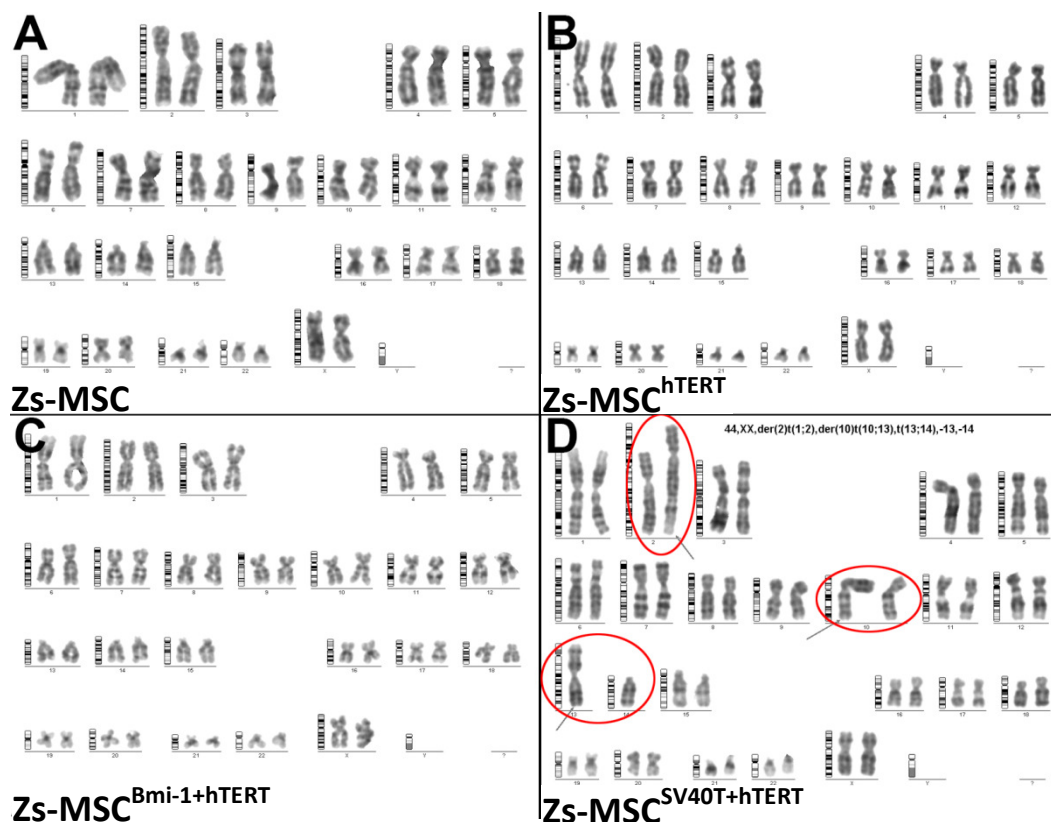
Az immortalizációt követően mindegyik sejtvonala kifejezte továbbra is azokat a sejtfelszíni antigéneket, amelyek tipikusan jellemzőek erre a sejt típusra. A CD44, CD73, CD90 és CD105 immunmarkerekre mutatott nagyfokú pozitívítással ellentétben a hematopoetikus eredetű sejtekre jellemző CD3, CD14, CD19, CD34, CD45 és HLA-DR antigénekre mindegyik sejtvonala negatívnak bizonyult. A csont irányú differenciáció harmadik hetében a $Zs-MSC^{h-TERT}$, $Zs-MSC^{Bmi-1}$ és $Zs-MSC^{Bmi-1+hTERT}$ sejtvonalak esetében is végbement a RUNX2 transzkripció faktor sejtmagba történő transzlokációja, az alkalikus foszfatáz aktivitása nagymértékben megnőtt, és az extracelluláris állományban pedig jelentős mennyiségű kalcium halmozódott fel (**22. ábra A-C**). Ugyanezen sejtek zsír irányú differenciációja is sikeresnek bizonyult kísérleteink során (**22. ábra D**). Ezzel ellentétben a $Zs-MSC^{SV40T+hTERT}$ sejtvonala esetében a RUNX2 transzlokációja nem ment végbe oszteogén indukció hatására és a sejtek a zsír irányú differenciációs protokollra sem adtak megfelelő választ.



22. ábra Csont és zsír irányú differenciációs képesség vizsgálata. (A) A *RUNX2* transzkripciós faktor immuncitokémiai jelölése a differenciáció 1. napján (baloldali képrészlet) és három hét elteltével (jobboldali képrészlet). (B) Alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának kimutatása kromogén szubsztrát hozzáadásával. (C) Az extracelluláris térben felhalmozódott kalcium kimutatása Alizarin vörös festéssel. (D) Zsír irányú differenciációs képesség vizsgálata Oil Red O festéssel.

4.3.6 Kariotípus meghatározása és a tumorképző képesség vizsgálata

Azoknál a sejtvonalaknál, amelyeknél még az 50. populációkettőződést követően is aktív sejtosztódást figyeltünk meg, citogenetikai analízist végeztünk, valamint a sejteket immundeficiens egerek szervezetébe oltottuk azzal a céllal, hogy megvizsgáljuk a tumorképző képességüket. A $Zs-MSCH-TERT$ és $Zs-MSCBmi-1+hTERT$ sejtvonalak esetében nem találtunk semmiféle rendellenességet, viszont a hTERT és SV40T antigén együttes bevitelével immortalizált sejteknél számos kromoszóma-aberrációt figyeltünk meg. Ezek között előfordultak teljesen hiányzó kromoszómák és rendellenes transzlokációk egyaránt (**23. ábra**). Annak ellenére, hogy a $Zs-MSCSV40T+hTERT$ sejtvonalnál számos kromoszomális rendellenességet találtunk és ezek a sejtek meglehetősen agresszív növekedést mutattak *in vitro*, egyik immortalizált MSC sejtvonal esetében sem tapasztaltunk tumorképződést a kísérletekhez használt NOD/SCID gamma egerekben a 12 hétig tartó megfigyelési periódus alatt.

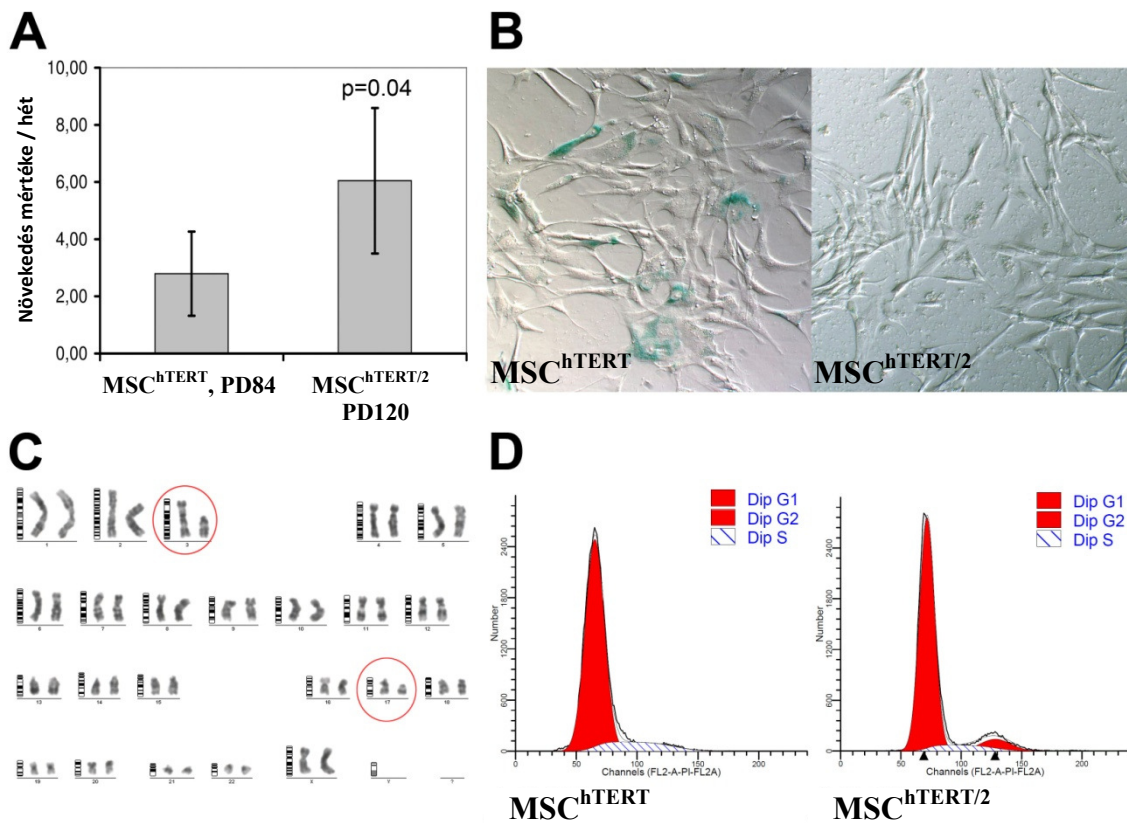


23. ábra Immortalizált mezenchimális őssejtvonalak kromoszóma vizsgálatának eredménye. Az 50. populációkettőzödést túlélő sejtvonalak, valamint a parentális, vad típusú mezenchimális őssejtek kariotípus-meghatározása. Kromoszomális rendellenességet csak a Zs-MSC^{SV40T+hTERT} sejtvonal esetében tapasztaltunk.

4.3.7 A Zs-MSC^{hTERT} sejtvonal lehetséges transzformációja magas passzázs-szám mellett

A 100. populációkettőzödést követően a hTERT transzgént kifejező sejtek esetében az osztódási sebesség erőteljes növekedését tapasztaltuk. A megváltozott populációt a továbbiakban külön sejtvonalként kezeltük, Zs-MSC^{hTERT/2} néven. Az észrevétellel párhuzamosan a Zs-MSC^{h-TERT} sejtvonal egy korábbi, 83. populációkettőzödést követően lefagyasztott és megőrzött mintáját vetettük újabb vizsgálatok alá illetve hasonlítottuk össze a megváltozott populáció sejtjeivel. A vizsgálatokat az eredeti populáció esetében a 84. és 110. PD közötti időszakban végeztük el, míg a megváltozott populáció sejtjeit a 120. PD időpontjában vizsgáltuk (**24. ábra**). A populációk (h-TERT

ill. h-TERT/2) átlagos növekedési üteme hetente 2.8 ± 1.5 -szeres illetve 6.0 ± 2.5 -szeres mértékű volt ($P = 0.04$) (**24. ábra A**). Az eredeti populáció sejtjei a vad típusú őssejtekhez hasonlóan megtartották eredeti morfológiai sajátosságukat illetve a szenescencia-asszociált β -galaktozidáz festés eredményei is hasonlóak bizonyultak. Zs- $MSC^{hTERT/2}$ populáció sejtjei ezzel szemben a β -galaktozidáz festésre teljesen negatívnak bizonyultak és morfológiai sajátosságaik is eltérőek voltak (**24. ábra B**). Amíg az eredeti populációnál semmiféle elváltozást nem találtunk a citogenetikai vizsgálatok során, addig a Zs- $MSC^{hTERT/2}$ esetében számos - nem klonális eredetű - eltérést figyeltünk meg, melyek közül az egyik vizsgálati eredmény a **23/C. ábrán** látható. A sejtciklus-vizsgálat eredményei azt mutatták, hogy amíg a Zs- MSC^{hTERT} populáció sejtjei a konfluens kultúrában már nem mutattak mitotikus aktivitást (G2/M fázisú sejtek aránya: 0.28%), addig a Zs- $MSC^{hTERT/2}$ populáció sejtjeinél nem lépett fel kontakt-gátlás és a sejtek a konfluens kultúrában is tovább szaporodtak (G2/M fázisú sejtek aránya: 8.57%) (**24. ábra D**). A transzformáció egyik lehetséges okaként a veszélyes génszakaszokba - pl. tumorszupresszor gének vagy proto-onkogének) történő lentivirális inszerciót feltételeztük. A továbbiakban emiatt az inszerció pontos helyének meghatározását tűztük ki célul, melyet ligáció-közvetített PCR reakciók segítségével valósítottunk meg. Mind az eredeti, mind pedig a megváltozott populáció esetében ugyanazt a két inszerciós helyet sikerült azonosítanunk. Az egyik provírus az 5. kromozómán található „hypothetical protein LOC65250” nevű, ismeretlen funkciójú fehérjét kódoló génszakaszba integrálódott, míg a másik provírus inszerciós helye a 3. kromozómán lévő, „TBC1 domain family member 5” gént kódoló szakasza. Az inszerciós helyek ismeretében kijelenthetjük, hogy a transzformációt kiváltó ok valószínűleg nem a virális szekvenciák genomba történő integrálódása volt.



24. ábra A Zs-MSCh^{TERT} és Zs-MSCh^{TERT/2} sejtvonalak összehasonlítása. (A) A két populációnál mérhető átlagos heti növekedési ráta összehasonlítása sejtszámolás alapján. (B) Szenescencia-asszociált β -galaktozidáz festés (C) A Zs-MSCh^{TERT/2} populáció kariotipusa. A 3. és 17. kromoszómákon nagy kiterjedésű deléciók figyelhetők meg. (D) Konfluens sejtkultúrák sejtciklus vizsgálata. A G2/M fázisban lévő sejtek aránya 0.28% volt az eredeti sejtvonalnál, míg ugyanez az arány 8.57% volt a Zs-MSCh^{TERT/2} populáció esetében.

5. Megbeszélések

Annak ellenére, hogy számos erőfeszítés irányul a mezenchimális őssejtek immunszuppresszív aktivitásáért felelős mechanizmusok pontos tisztázására, amelyek a T limfociták funkcionális gátlásáért felelősek [89,90], a kontaktus-függő, valamint membrán-közvetített jelátviteli folyamatok még nem teljesen tisztázottak. A legfrissebb eredmények egybehangzóan azt mutatják, hogy az immunválasz szabályozásában aktívan részt vevő, különféle bioaktív molekulák szállításában membránnal határolt partikulumok is részt vesznek. Számos ilyen bioaktív molekuláról bebizonyosodott már, hogy szállításuk extracelluláris vezikulák közvetítésével zajlik [43,70,91].

Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulákról bebizonyosodott, hogy számos olyan mRNS szállításáért és célba juttatásáért felelősek, amelyek immunmoduláló hatással rendelkeznek [65]. Azt is sikerült bizonyítani, hogy több olyan miRNS molekula dúsul fel ezekben az vezikulákban, melyek funkciója kapcsolatba hozható az immunrendszer szabályozásával [66]. Ráadásul az MSC-eredetű EV-k proteomikai vizsgálata arra is fényt derített, hogy számos olyan fehérjét hordoznak, amelyek érintettsége a különféle gyulladási folyamatokban ma már egyértelműen bizonyított [50,67]. Viszont annak ellenére, hogy a biológiailag aktív molekulák tekintetében a mikrovezikulák és exoszómák között jelentős különbség valószínűsíthető az eltérő eredetükből kifolyólag [49], a pontos szerepük az MSC-k parakrin hatásában még nem tisztázott [69]. Fontos megjegyezni, hogy bár a tipikus MSC exoszómák funkcionális aktivitása jól körülírt [92], mégis nagyon ritkán ellenőrzik valamilyen membrán jelölő technika segítségével, hogy az akceptor immunsejtek valóban felveszik-e az exoszómákat vagy mikrovezikulákat.

Bár az elmúlt időszakban egyre több kutatócsoport kezdett el foglalkozni az MSC-eredetű EV-k immunmoduláló aktivitásának vizsgálatával [54,55], a sejtek által kibocsájtott membrán partikulumokat a szakirodalomban számos különböző elnevezéssel illetik, így nagyon nagy szükség lenne a nevezéktan egységesítésére. A tudományos cikkekben nagyon gyakran nevezik mikrovezikuláknak a tipikus exoszómákat, illetve az exoszóma izolátumok sokszor tartalmazzák a teljes mikrovezikula frakciót is a leközölt izolálási protokollok alapján. Számos kísérleti rendszer esetében megfigyelhető továbbá, hogy az izolálás során alkalmazott metódus

alapján az MSC-eredetű exoszóma izolátumok tartalmaztak tipikus mikrovezikulákat is [80], vagy a mikrovezikulaként megjelölt EV frakció mikrovezikulák és exoszómák keverékéből tevődött össze [65,66,81,84]. Néhány esetben a tipikus exoszómákat mikrovezikulaként említik [81,93].

Mostanáig csak néhány tanulmány foglalkozott az MSC-EV-k T limfocitákra gyakorolt immunszuppresszív aktivitásával, és a leközölt adatok meglehetősen ellentmondásosak azzal kapcsolatban, hogy ezek az extracelluláris vezikulák valóban olyan hatásosak-e az *in vitro* kísérletek során, mint maguk az MSC-k [80-83]. Némi aggodalomra adhat okot, hogy több tudományos munka alapján is úgy tűnik, hogy a perifériás vér mononukleáris sejtjei közül leginkább a monociták és B limfociták képesek az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák felvételére. Ezzel ellentétben a T limfociták és természetes ölősejtek (NK sejtek) csak egy nagyon kis hányadán mutatható ki MSC-EV eredetű membrán pozitivitás meghatározott időtartamú inkubációt követően [83,84].

Összehasonlító tanulmányaink során részletesen megvizsgáltuk az intercelluláris transzport mechanizmusokat közvetlen sejt-sejt, valamint sejt-EV ko-kultúrák esetében, hogy különbséget tegyünk azok között az interakciók között, amelyek közvetlen sejt-sejt kapcsolatok során mennek végbe, vagy sikeresen reprodukálhatóak extracelluláris vezikulák közvetítésével. Fontos megjegyezni, hogy kísérleti modelljeinkben homogén, tiszta mikrovezikula vagy exoszóma izolátumokat használtunk, mivel a homogén MV és EXO partikulumok szerepe a mezenchimális őssejtek és T limfociták közötti membrán és citoplazma transzportfolyamatok tekintetében még nem tisztázott.

Az eredményeink azt mutatják, hogy sem az egér timociták – melyeket nagyrészt éretlen T sejtek alkotnak – sem a humán perifériás T limfociták nem képesek számottevő, zsírszövet-eredetű MSC-EV felvételére függetlenül attól, hogy allogén vagy xenogén kísérleti modellt alkalmaztunk. Ugyanez vonatkozik a T-sejt eredetű limfoblasztoid Jurkat sejtvonagra is. Ezzel a megfigyeléssel összhangban azt tapasztaltuk, hogy egyik EV populációnak sem volt funkcionális hatása a T limfocitákra nézve, az aktivált T-sejtek osztódását és IFN- γ termelését az MSC-eredetű mikrovezikulák és exoszómák sem voltak képesek gátolni. A stimuláció típusától függetlenül – a sejtosztódás mitogénnel történő aktivációja (ConA) vagy CD3/CD28 mikrogyöngyökkel történő receptor-specifikus aktiváció – tehát semmiféle sejtosztódást

gátló aktivitást nem sikerült kimutatnunk. Hasonló eredményekről számolt be Conforti és munkatársai [81], hiszen kísérletük során az MSC-eredetű EV-k nem csökkentették számottevő mértékben az *in vitro* stimulált T-sejtek osztódását, ám az MSC – T limfocita ko-kultúrák esetében egy nagyon erőteljes gátlást tapasztaltak.

Érdekes módon a fordított kísérleti felállás esetében azt tapasztaltuk, hogy a Zs-MSC-k nagy mennyiségű membrán komponenset vettek fel, függetlenül attól, hogy ezek a membrán összetevők melyik donor sejttípustól származtak. Az allogén és xenogén modellek között nem tapasztaltunk számottevő különbséget, azt leszámítva, hogy a humán Zs-MSC-k nyilvánvalóan kevesebb egér timocitákból származó membrán összetevőt akkumuláltak, mint az egérből származó Zs-MSC-k. A funkcionális vizsgálatainkból az is kiderült, hogy ha a mezenchimális őssejteket kezeljük aktivált T limfocita-eredetű extracelluláris vezikulákkal, az MSC-k válaszul egy igen erőteljes PGE₂ termelést mutatnak, amely dózisfüggő módon megy végbe mind az MV, mind az EXO kezelés hatására. A T limfociták aktiválását ezekben a kísérletekben receptorfüggő aktivációval, tehát CD3/CD28 mikroyöngyök segítségével valósítottuk meg. A szakirodalomban fellelhetők hasonló megfigyelések, például különböző tumoros sejtvonalakból izolált exoszómák bizonyítottan megváltoztatják az MSC-k fenotípusát [94].

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

mikroszkóp segítségével is. Rengeteg, T limfocitáktól származó membrán nanocső volt megfigyelhető a ko-kultúrákban, amelyek direkt összeköttetést biztosítottak a szöveti őssejtekkel. Az MSC – Jurkat ko-kultúrák vizsgálata során a két sejtípus között ilyen direkt összeköttetést nem sikerült kimutatnunk, bár a Jurkat sejtek egymással sok esetben kapcsolódtak membrán nanocsövek segítségével. Ez a jelenség viszont már ismert a tudomány számára [95]. A membrán nanocsövek közvetítésével zajló kommunikáció az immunrendszer különböző sejtjei között már jól körülírt [96], ezen kívül ezt a fajta kommunikációt már leírták mezenchimális őssejtek és erőteljes stresszhatásnak kitett kardiomiociták között is, ahol a membrán nanocsövek által biztosított közvetlen citoplazma kapcsolatok valószínűleg fokozzák az MSC-k parakrin regeneráló hatását [97]. A nanocsövek által biztosított, mezenchimális őssejtek és T limfociták között zajló intenzív citoplazmatikus transzportfolyamatokról bár mostanáig semmit nem tudunk, valószínűleg szerepük meghatározó lehet a T-sejtek funkciójának gátlásában.

Eredményeink fényében nagyon valószínűnek tűnik, hogy az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák szerepe elhanyagolható a membrán- és citoplazmatikus összetevők T limfociták vagy épp Jurkat sejtek irányába történő átadásában, így valószínűleg nem ezek a partikulumok tehetők felelőssé az MSC-k T-sejtekre gyakorolt immunosuppresszív aktivitásáért. Mindazonáltal egy nagyon aktív kommunikáció zajlik a két sejtfeleség között, melynek meghatározó résztvevői a T-sejt eredetű extracelluláris vezikulák, valamint a szintén T-sejt eredetű membrán nanotubulusok. A T-sejtektől származó mikrovezikulák és exoszómák felvétele, valamint a nanocsövekeken keresztül történő citoplazmatikus komponensek átadása egyértelműen megváltoztatja a Zs-MSK-k immunmoduláló aktivitását, egy méginkább szuppresszív fenotípust eredményezve, és egyben indukálva olyan gyulladásgátló szolubilis faktorok termelését is, mint például a PGE₂. Kísérleteinkből az is kiderült, hogy citoplazmatikus összetevők átadása kétirányú az MSK-k és T-sejtek között, amiből az következik, hogy MSC-eredetű citoplazma összetevők is közvetlenül hatással lehetnek a T limfociták funkciójára.

Összegzés képpen azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a Zs-MSK-k T-sejtekre gyakorolt gátló hatása számos mechanizmus útján valósul meg. A különböző szolubilis mediátorok és citokinek szerepe ebben a folyamatban jól ismert [90], és a mi kísérleti rendszerünkben is bizonyítást nyert. Eredményeink alapján nyilvánvaló, hogy ezek a

szolubilis faktorok nem csak a T-sejtek, de a Jurkat limfóma sejtek osztódását is képesek önmagukban gátolni. A funkcionális esszéinkben – ahol stimulált primer T limfociták és Jurkat sejtek proliferációját és a T-sejtek IFN- γ termelését tanulmányoztuk – egymástól elkülönítve megvizsgáltuk az MSC-eredetű MV-k, EXO-k, valamint a vezikuláktól mentesített MSC-KM, tehát a szolubilis mediátorok hatását is. Egyes vélemények szerint az MSC-k immunszuppresszív fenotípust gyulladásozó környezetben mutatnak [74,89], viszont a mi megfigyelésünk az, hogy az egészséges donorokból származó mezenchimális őssejtek is képesek gátolni az aktivált T limfociták osztódását és IFN- γ termelését *in vitro* a szolubilis mediátorok termelésén keresztül. Bár az MSC-k immunmoduláló funkciójára kétségtelenül nagy hatással van az adott mikrokörnyezet *in vivo*, mégis úgy tűnik, hogy ezek a sejtek egy eredendő immunszuppresszív potenciállal rendelkeznek, mivel a rájuk jellemző szolubilis faktorokat spontán módon is folyamatosan termelik. Természetesen a legjelentősebb gátló hatás a CD4⁺ és CD8⁺ T-sejtek esetében is az MSC-k közvetlen jelenléte mellett, tehát a ko-kultúrákban volt megfigyelhető: a különbség az IFN- γ termelés gátlásában az MSC-KM hatásához képest szignifikánsnak bizonyult. A humán zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejtek és perifériás T limfociták közötti kommunikációban tehát mindenképpen meghatározó szerepe lehet a T-sejt eredetű EV-k felvételének, valamint a membrán nanotubulusokon keresztül zajló intenzív, kétirányú citoplazma transzportnak is.

Végezetül mindenképpen meg kell említeni az allogén kísérleti modellek alkalmazásának fontosságát és szükségességét mind *in vitro* és *in vivo*. Az emberi mezenchimális őssejteket ugyanis széles körben alkalmazzák *in vivo* egér betegségmodellek esetében [98,99]. Viszont a nagyon fontos effektor mechanizmusok terén alapvető különbségek vannak az egér és humán MSC-k között, és emiatt csak óvatosan szabad ilyen xenogén modellek működése alapján bármilyen következtetést levonni az emberi szervezetben való viselkedésükre vonatkozóan [89]. A mi xenogén modelljeinkben például azt találtuk, hogy az egér mezenchimális őssejtekkel ellentétben a humán MSC-k nem akkumuláltak egér timocitákból származó fluoreszcens calceint, ráadásul a timocita eredetű MV-k és EXO-k felvétele is sokkal kevésbé volt hatékony, mint az egér Zs-MSK-k esetében. Mivel ezek a különbségek valószínűleg *in vivo* is jelentkeznek, mindenképpen érdemes megfontolni az allogén kísérleti rendszerek alkalmazását az MSC-k által közvetített immunszuppresszív aktivitás vizsgálatához.

Munkánk második nagy fejezetében emberből származó primer, zsírszövet-eredetű mezenchimális őssejteket immortalizáltunk lentivirális génbeviteli rendszer segítségével.

Sajnos gyakori és nagy problémát jelent a gyakorlatban, hogy az MSC-k plaszticitása rövid időn belül radikálisan csökken, mígnem bekövetkezik a szenescencia állapota és az osztódásuk leáll. Az *in vitro* kísérletes munkákkal kapcsolatban viszont általános érvényű elvárás, hogy amennyire lehetséges, alacsony passzázs-számú MSC-k kerüljenek felhasználásra. A hosszadalmas, sztenderdizálást-optimizációt igénylő kísérletek esetében – mint amilyen az MSC-eredetű extracelluláris vezikulákkal végzett kutatómunka is – óriási haszna lehet egy immortalizált mezenchimális őssejt-vonalnak, feltéve persze, hogy ezek a sejtek rendelkeznek a primer sejtek azon tulajdonságaival, amelyek a kísérletes munka szempontjából relevánsak. A kapott eredmények validálása a primer kultúrákon persze elkerülhetetlen lenne, de mindenképpen megkönnyítené a munkát, és az értékes primer kultúrák további felhasználása sem kerülne veszélybe.

A mezenchimális őssejtek transzdukciója során a hTERT gén bevitelét kombináltuk a Bmi-1 és SV40T gének bevitelével. Munkánk során teszteltük azt is, hogy a hTERT vagy Bmi-1 gének bevitele önmagában képes-e a Zs-MSK-k immortalizálására, vagy csak együttes kifejeztetésük képes ezt sikeresen megvalósítani. Némelyik onkogén, mint például a HPV E6/E7 onkoproteinek, illetve proto-onkogén, mint amilyen a c-MYC képes önmagában is immortalizálni a mezenchimális őssejteket a hTERT kifejeztetése nélkül [39,40]. Ilyen esetekben, a telomeráz aktivitás onkogén által történő indukciója miatt az exogén hTERT kifejeztetésére elméletileg már nincs is szükség. A c-MYC mellett a Bmi-1 fehérjéről is bebizonyosodott, hogy indukálja a telomeráz aktivitást emlős epitel sejtekben [100,101]. Ráadásul őssejtek esetében bizonyítást nyert az is, hogy a Bmi-1 gátolja a sejtek szenescenciáját a telomeráz gátlásának feloldásán keresztül [102].

A Bmi-1 gén bevitelét követően mi is megvizsgáltuk, hogy önmagában képes-e lényegesen meghosszabbítani a Zs-MSK-k élettartamát. Azt tapasztaltuk, hogy az átlagos provírus kópiaszám az idő előrehaladtával növekedett. Eszerint bizonyos Zs-MSK^{Bmi-1} klónok, melyek magasabb szinten expresszálták a Bmi-1 gént, szelekciós előnyre tettek szert a populáció egyéb sejtjeivel szemben, viszont a populáció végül

nem volt képes elkerülni a szeneszencia állapotát és végül osztódásuk leállt. Elképzelhető, hogy a tenyészet további fenntartásával olyan klónok bukkantak volna fel, amelyek elkerülik a replikatív krízist és indukálódik telomeráz aktivitásuk, ahogyan ezt a Bmi-1 génnel transzdukált placenta-eredetű MSC-k esetében már megfigyelték [38].

A hTERT gén bevitelét követően Zhang és munkatársai azt találták, hogy a transzdukciót követő 20. populáció kettőződést megelőzően a sejtek osztódása már leállt [38]. Ezzel ellentétben Moustapha Kassem kutatócsoportjának eredményei alapján a hTERT gén bevitele önmagában is elegendő a csontvelő-eredetű MSC-k immortalizálásához [103]. Hasonlóképpen a köldökzsinórvér-eredetű mezenchimális őssejtek hTERT-mediált immortalizációjához sem volt szükség a p16^{Ink4a}/Rb útvonalak gátlására [104]. Ezek az eredmények megkérdőjelezzik bármiféle növekedést indukáló gén bevitelének szükségességét. Az onkogének vagy proto-onkogének használatának elkerülése kétségkívül öröndetes lenne és az immortalizáció szempontjából, egy sokkal elegánsabb és biztonságosabb eljárást eredményezve. Kiderült azonban, hogy a hTERT által biztosított korlátlan replikációs képesség meglehetősen termékeny talajt biztosít a potenciálisan transzformáló mutációk megszerzéséhez. Kassem és munkatársai arról számoltak be, hogy a hTERT génnel transzdukált emberi MSC-k az intenzív tenyésztés hatására egy idő után transzformálódtak, és többféle kritikus genetikai eltérést is mutattak: Ink4a/ARF lókuszbili deléciója, K-RAS aktivációs mutációja, valamint a DBCCR1 tumor szupresszor gén promóterének hipermetilációja [105].

Az általunk transzdukált Zs-MSCh^{TERT} populáció esetében is szelektív előnyre tett szert egy olyan klón, amely hasonló módon transzformálódott a 83. populációkettőződést (PD) követően. Ez a klonális eredetű sejtvonal (Zs-MSCh^{TERT}/2) jóval intenzívebb sejtosztódást mutatott az eredeti populációhoz képest, szeneszencia-asszociált β -Galaktozidáz festődést nem mutatott, és a kontaktagtlás teljes hiányát mutatta. Bár a lentivirális transzdukció és a transzformáció között körülbelül 100 populáció-kettőződés történt, a Zs-MSCh^{TERT}/2 provirális integrációs mintázata azonos volt a nem transzformálódott eredeti populáció korai integrációs mintázatával. A két integrációs hely közül egyik sem okozott onkogén cisz-aktivációt vagy tumor szupresszor inaktivációt, tehát a transzformáció oka másban keresendő. Az expanszív klón valószínűleg PD83 után keletkezett, mivel ez a transzformációs esemény nem történt meg újra, miután az eredeti, lefagyasztott PD83 állapotú populációt ismét

tenyésztteni kezdtük. A Zs- $MSC^{hTERT}/2$ sejtvonallal lehetséges genetikai változásainak azonosításához, valamint az ismételt kísérletek esetén fellépő újabb transzformációs esemény valószínűségének becsléséhez további vizsgálatokra lenne szükség. Nem világos ugyanis, hogy az általunk megfigyelt kromoszómális abnormalitások a transzformáció eredményei-e, vagy pedig már eleve jellemezték azt az adott sejtet, amelyből ez a sejtvonallal később létrejött. A sejttenyésztő médiumhoz hozzáadott FGF-2 lehetséges szerepe a transzformációs folyamatban szintén megfontolandó, hiszen az emberből származó, FGF-2 tartalmú médiumban tenyésztett csontvelő-eredetű MSC-k spontán transzformációját már megfigyelték [106]. Mindenesetre a saját és mások megfigyelései alapján kijelenthetjük, hogy az exogén hTERT fokozott expressziója fogékonyra teheti a mezenchimális őssejteket a transzformáló mutációk beszerzésére [107,108], annak ellenére, hogy a transzformáció tényleges előfordulása meglehetősen sztochasztikus, és valószínűleg a magas PD szint eléréséig csak ritkán fordul elő [109]. A kombinált immortalizációs megközelítés, azaz a hTERT gén együttes bevitele egy növekedést serkentő onkogénnel feltételezhetően segít elnyomni a jelentős szelekciós előnnyel bíró mutáns klónok kialakulását. Így, kissé paradox módon, a hTERT bevitele egy megfelelő növekedést promótáló gén bevitelével kombinálva – amely önmagában nem transzformálja az MSC-eket és lehetővé teszi fenotípusuk és differenciálódási potenciáljuk megőrzését – segíthet még stabilabb sejtvonalak létrehozásában.

Várakozásainknak megfelelően az SV40 T antigen – bár kétségkívül egy nagyon hatékony immortalizáló ágens – nem volt alkalmas a mezenchimális őssejtekre jellemző fenotípus megőrzésére az immortalizációt követően. Másrészt viszont a Bmi-1 és hTERT gének együttes bevitele folyamatos és stabil növekedést biztosított populáció számára, a sejtek alapvető tulajdonságainak megváltoztatása nélkül. Ahogyan arra már korábbi tanulmányokban is rámutattak, az MSC-k és más rokon sejtípusok – mint például a cementoblaszt progenitor sejtek – sikeresen immortalizálhatóak a hTERT és Bmi-1 segítségével, ráadásul a 100. populáció kettőződésig ezeknél a sejtvonallal semmilyen transzformációt nem mutattak ki, valamint a sejtek sikeresen megőrizték multipotens képességüket is [38,110]. Ezekkel a megfigyelésekkel összhangban mi is azt tapasztaltuk, hogy a Zs- $MSC^{Bmi-1+hTERT}$ sejtvonallal oszteogén és adipogén indukciója még PD74-nél is sikeres volt, és még PD120 után sem mutatkozott semmilyen transzformációra utaló jel. Annak ellenére, hogy idő közben a magas provirus

kópiaszámú sejtek szelekciós előnyre tettek szert, a sejtek osztódási sebessége végül lelassult, viszont szenescenciát nem mutattak.

Összefoglalásként elmondhatjuk, hogy sikerült olyan immortális Zs-MSC sejtvonalat létrehozunk, amelynek differenciációs potenciálja a primer sejtekhez visznyítva semmit sem változott, és esetükben transzformációra utaló jelet sem tapasztaltunk. A későbbiekben mindenképpen szeretnénk tisztázni a Zs-MSC^{hTERT} sejtvonala transzformációjának pontos okait, valamint igyekszünk olyan potenciális immortalizáló géneket keresni, melyek segítségével stabil Zs-MSC-eredetű sejtvonalkat hozhatunk létre.

6. Következtetések

1. Az eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy sem az egér timociták, sem a humán T-sejtek vagy Jurkat limfóma sejtek nem képesek számottevő, Zs-MSK eredetű MV vagy EXO felvételére függetlenül attól, hogy allogén vagy xenogén kísérleti modellt alkalmaztunk. A ko-kultúra modellek esetében ugyanezt tapasztaltuk.
2. Ezzel a megfigyeléssel összhangban azt találtuk, hogy az aktivált T-sejtek osztódását és IFN- γ termelését az MSK-eredetű MV-k és EXO-k sem képesek gátolni még óriási feleslegben sem a sejtek számához viszonyítva.
3. Zs-MSK-k nagy mennyiségű membrán komponenst vettek fel, függetlenül attól, hogy ezek az összetevők melyik donor sejttől származtak. A ko-kultúra modellek eredményeit sikeresen reprodukáltuk megfelelő mennyiségű MV vagy EXO partikulum hozzáadásával, így sikerült bizonyítanunk, hogy a membrán komponensek átadásáért az extracelluláris vezikulák felelősek.
4. A funkcionális vizsgálatainkból az is kiderült, hogy az MSK-k aktivált T limfocita-eredetű EV-k hatására igen erőteljes PGE₂ termelést mutatnak, amely dóziszfüggő módon megy végbe mind az MV, mind az EXO kezelés hatására. Ilyen módon sikerült bizonyítanunk, hogy a T limfociták az extracelluláris vezikulákon keresztül közvetlen módon képesek befolyásolni az MSK-k immunszuppresszív aktivitását.
5. Munkánk során megállapítottuk, hogy sem az egér timociták, sem a Jurkat limfóma sejtek nem képesek a MSK-eredetű citoplazmatikus calcein felvételére, viszont az MSK-k és T-sejtel között egy nagyon intenzív, kétirányú citoplazmatikus transzport zajlik. A sejtplazma eredetű fluoreszcens calcein átadásához mindenképpen szoros sejt-sejt kapcsolatok szükségesek, és ebben a folyamatban az EV-k szerepe nem bizonyítható. Vizsgálataink során egy eddig még ismeretlen kölcsönhatás meghatározó szerepét sikerült bizonyítanunk, ahol a citoplazma intenzív átadása a két sejt-típus között membrán nanocsöveken keresztül valósul meg.
6. Az aktivált T-sejt osztódásának és IFN- γ termelésének gátlása szignifikánsan nagyobb volt a közvetlen sejt-sejt kapcsolatoknak köszönhetően, mint szolubilis faktorok és citokinek alkalmazása esetén, vagyis az MSK-KM használatánál. A membrán nanocsövek által biztosított, MSK-k és T-sejtek között zajló intenzív

citoplazmatikus transzportfolyamat tehát a T-sejtek funkciójára bizonyítottan hatással van, és valószínűleg az őssejtek fenotípusára is befolyással bír.

7. Az MSC-k immortalizációját célzó kísérleteknél önmagában a Bmi-1 gén bevitelével sikerült jelentősen meghosszabítanunk a populáció élettartamát (PD55), ám PD60-nál a teljes populáció szenescenciát mutatott. A hTERT gén bevitele önmagában egy idő után transzformációt okozott bizonyos sejtekben, amelyek később jelentős szelekciós előnyre tettek szert (PD83 után).
8. A hTERT és Bmi-1 gének együttes bevitelével sikerült olyan stabil immortális Zs- MSC sejtvonalat létrehozni, amelynek alapvető tulajdonságai – többek között differenciációs potenciálja – a primer sejtekhez viszonyítva semmit sem változtak, és esetükben transzformációra utaló jelet sem találtunk.

7. Összefoglalás

A mezenchimális őssejtek kiemelkedő gyulladásgátló és immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek *in vitro* és *in vivo* egyaránt, melynek középpontjában különböző citokinek és faktorok termelése áll, e mellett azonban a közvetlen sejt-sejt kapcsolatoknak is meghatározó szerepük van. Az MSC-eredetű extracelluláris vezikulák immunmoduláló aktivitásának szerepe a T-sejtek funkcionális gátlásában viszont még tisztázásra vár.

Munkánk során részletesen megvizsgáltuk az MSC-k és az emberi T-sejtek, T-sejt eredetű limfoblasztoid Jurkat sejtek, valamint egér timociták között zajló intercelluláris transzport mechanizmusokat, hogy különbséget tegyünk azon interakciók között, amelyek közvetlen sejt-sejt kapcsolatok révén, szolubilis mediátorok, vagy EV-k közvetítésével mennek végbe. Eredményeink azt mutatják, hogy sem az egér timociták, sem a humán T- vagy Jurkat-sejtek nem képesek számottevő, Zs-MSC eredetű EV felvételére, továbbá az aktivált T-sejtek osztódását és IFN- γ termelését az MSC-eredetű EV-k nem képesek gátolni. Ugyanakkor a Zs-MSC-k nagy mennyiségű membrán komponenset vettek fel, függetlenül attól, hogy ezek az összetevők melyik donor sejtől származtak. A funkcionális vizsgálatainkból az is kiderült, hogy az MSC-k aktivált T limfocita-eredetű EV-k hatására igen erőteljes PGE₂ termelést mutatnak, amely dóziszfüggő módon megy végbe mind az MV, mind az EXO kezelés hatására. Sikerült tehát bizonyítanunk, hogy a T limfociták az extracelluláris vezikulákon keresztül közvetlen módon képesek befolyásolni az MSC-k immunszuppresszív aktivitását. A citoplazmatikus összetevők átadásának vizsgálata során megállapítottuk, hogy sem az egér timociták, sem a Jurkat sejtek nem képesek a MSC-eredetű citoplazmatikus calcein felvételére, viszont az MSC-k és T-sejtek között intenzív, kétirányú citoplazmatikus transzport zajlik. A fluoreszcens calcein átadásához mindenképpen szoros sejt-sejt kapcsolatok szükségesek, és ebben a folyamatban az EV-k szerepe nem bizonyítható. A membrán nanocsövek által biztosított intenzív citoplazmatikus transzportfolyamatok szerepe viszont meghatározó, amely bizonyítottan hatással van a T-sejtek funkciójára.

Végül, sikerült olyan immortális Zs-MSC sejt vonalat létrehozni, amelynek alapvető tulajdonságai – többek között differenciációs potenciálja – a primer sejtekhez viszonyítva semmit sem változott, és esetükben transzformációra utaló jelet sem tapasztaltunk.

8. Summary

Mesenchymal stem cells have powerful immunosuppressive and anti-inflammatory potential both *in vitro* and *in vivo*. Their inhibitory activity is mainly caused by the production of various cytokines and factors, but direct cell-to-cell contacts also play a decisive role. However, the role of immunomodulatory activity of MSC-derived extracellular vesicles in the functional inhibition of human peripheral T-cells, is still needs to be clarified.

In our comparative studies, we investigated intercellular transport mechanisms between MSCs and human peripheral T-cells, T cell derived lymphoblastoid Jurkat cells and mouse thymocytes, in order to draw a distinction between those interactions which require close cell-cell contacts, and those that can be effectively reproduced by using isolated EVs or the MSC-conditioned medium *per se*. Our results show that neither mouse thymocytes, human T cells nor Jurkat lymphoma cells are able to incorporate significant amount of EVs derived from Zs-MSCs, moreover the MSC-derived EVs can not inhibit the proliferation and IFN- γ production of activated T cells. Interestingly, MSCs incorporated a large amount of membrane components irrespective of the type of donor cells. In our functional studies, both the MVs and EXOs derived from activated T cells induced a robust production of PGE2 in MSCs in a dose-dependent manner, proving the functionality of these particles. Consequently, we have successfully demonstrated that T cells can directly influence the immunosuppressive activity of MSCs via extracellular vesicles. During the examination of the transfer of cytoplasmic components it was found that neither mouse thymocytes nor Jurkat lymphoma cells are capable to gain MSC-derived cytoplasmic calcein, but a very intensive bidirectional cytoplasmic transport exists between MSCs and T-cells. The transfer of cytoplasmic calcein definitely requires close cell-cell connections and the role of EVs can not be confirmed in this process. However, the role of tunneling nanotubes during the intensive cytoplasmic transport processes between MSCs and T cells is decisive, and definitely alter the function of T cells.

Finally, we also aimed to establish immortalized cell lines derived from primary Zs-MSCs. Based on our results, we have succeeded in creating an immortal Zs-MSC cell line whose basic properties, including its differentiation potential, did not change compared to the primary cells and did not show any transformation event.

9. Irodalomjegyzék

1. Caplan AI and SP Bruder. (2001). Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *Trends in Molecular Medicine* 7:259-264.
2. Morrison SJ and DT Scadden. (2014). The bone marrow niche for haematopoietic stem cells. *Nature* 505:327-334.
3. Abu Kasim NH, V Govindasamy, N Gnanasegaran, S Musa, PJ Pradeep, TC Srijaya and ZACA Aziz. (2012). Unique molecular signatures influencing the biological function and fate of post-natal stem cells isolated from different sources. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 9:E252–E266.
4. Meirelles LDS, PC Chagastelles and NB Nardi. (2006). Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of Cell Science* 119:2204-2213.
5. Hass R, C Kasper, S Bohm and R Jacobs. (2011). Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Communication and Signaling* 9:12.
6. Dominici M, K Le Blanc, I Mueller, I Slaper-Cortenbach, FC Marini, DS Krause, RJ Deans, A Keating, DJ Prockop and EM Horwitz. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8:315-317.
7. Atoui R and RCJ Chiu. (2012). Concise Review: Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells in Cellular Transplantation: Update, Controversies, and Unknowns. *Stem Cells Translational Medicine* 1:200-205.

8. Marigo I and F Dazzi. (2011). The immunomodulatory properties of mesenchymal stem cells. *Seminars in Immunopathology* 33:593-602.
9. Yi T and SU Song. (2012). Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells and Their Therapeutic Applications. *Archives of Pharmacal Research* 35:213-221.
10. Gao F, SM Chiu, DA Motan, Z Zhang, L Chen, HL Ji, HF Tse, QL Fu and Q Lian. (2016). Mesenchymal stem cells and immunomodulation: current status and future prospects. *Cell Death Dis* 7:e2062.
11. Gebler A, O Zabel and B Seliger. (2012). The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends in Molecular Medicine* 18:128-134.
12. Najar M, G Raicevic, H Fayyad-Kazan, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2016). Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* 18:160-171.
13. Tyndall A. (2014). Mesenchymal stem cell treatments in rheumatology-a glass half full? *Nature Reviews Rheumatology* 10:117-124.
14. Soleymaninejadian E, K Pramanik and E Samadian. (2012). Immunomodulatory Properties of Mesenchymal Stem Cells: Cytokines and Factors. *American Journal of Reproductive Immunology* 67:1-8.
15. Fontaine MJ, H Shih, R Schaefer and MF Pittenger. (2016). Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects. *Transfusion Medicine Reviews* 30:37-43.
16. Fajka-Boja R, VS Urban, GJ Szebeni, A Czibula, A Blasko, E Kriston-Pal, I Makra, A Hornung, E Szabo, F Uher, NG Than and E Monostori. (2016).

Galectin-1 is a local but not systemic immunomodulatory factor in mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 18:360-70.

17. Najar M, G Raicevic, E Crompton, H Fayyad-Kazan, D Bron, M Toungouz and L Lagneaux. (2016). The Immunomodulatory Potential of Mesenchymal Stromal Cells: A Story of a Regulatory Network. *J Immunother* 39:45-59.
18. Castro-Manrreza ME and JJ Montesinos. (2015). Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of Immunology Research* 2015:394917.
19. Aggarwal S and MF Pittenger. (2005). Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* 105:1815-1822.
20. Wang Y, X Chen, W Cao and Y Shi. (2014). Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nature Immunology* 15:1009-1016.
21. Sun LY, DD Wang, J Liang, HY Zhang, XB Feng, H Wang, BZ Hua, BJ Liu, SQ Ye, XA Hu, WR Xu, XF Zeng, YY Hou, GS Gilkeson, RM Silver, LW Lu and ST Shi. (2010). Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Severe and Refractory Systemic Lupus Erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 62:2467-2475.
22. Bai L, DP Lennon, AI Caplan, A DeChant, J Hecker, J Kranso, A Zaremba and RH Miller. (2012). Hepatocyte growth factor mediates mesenchymal stem cell-induced recovery in multiple sclerosis models. *Nature Neuroscience* 15:862-U86.
23. Gordon D, G Pavlovska, JB Uney, DC Wraith and NJ Scolding. (2010). Human Mesenchymal Stem Cells Infiltrate the Spinal Cord, Reduce Demyelination, and Localize to White Matter Lesions in Experimental Autoimmune

- Encephalomyelitis. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology* 69:1087-1095.
24. Murray IR, CC West, WR Hardy, AW James, TS Park, A Nguyen, T Tawonsawatruk, L Lazzari, C Soo and B Peault. (2014). Natural history of mesenchymal stem cells, from vessel walls to culture vessels. *Cellular and Molecular Life Sciences* 71:1353-1374.
 25. Kamprom W, P Kheolamai, Y U-Pratya, A Supokawej, M Wattanapanitch, C Laowtammathron and S Issaragrisil. (2016). Effects of mesenchymal stem cell-derived cytokines on the functional properties of endothelial progenitor cells. *European Journal of Cell Biology* 95:153-163.
 26. Nardi NB. (2014). Therapeutic potential of mesenchymal stem cells in regenerative medicine. *International Journal of Molecular Medicine* 34:S11-S11.
 27. Pittenger MF, AM Mackay, SC Beck, RK Jaiswal, R Douglas, JD Mosca, MA Moorman, DW Simonetti, S Craig and DR Marshak. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 284:143-147.
 28. Stoltz JF, N de Isla, YP Li, D Bensoussan, L Zhang, C Huselstein, Y Chen, V Decot, J Magdalou, N Li, L Reppel and Y He. (2015). Stem Cells and Regenerative Medicine: Myth or Reality of the 21th Century. *Stem Cells International* 2015:734731.
 29. Phinney DG, G Kopen, W Righter, S Webster, N Tremain and DJ Prockop. (1999). Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 75:424-436.
 30. Siddappa R, R Licht, C van Blitterswijk and J de Boer. (2007). Donor variation and loss of multipotency during in vitro expansion of human mesenchymal stem

- cells for bone tissue engineering. *Journal of Orthopaedic Research* 25:1029-1041.
31. Gao K, YR Lu, LL Wei, XF Lu, SF Li, L Wan, YP Li and JQ Cheng. (2008). Immortalization of mesenchymal stem cell from bone marrow of rhesus monkey by transfection with human telomerase reverse transcriptase gene. *Transplantation Proceedings* 40:634-637.
 32. Huang GP, ZJ Pan, JP Huang, JF Yang, CJ Guo, YG Wang, Q Zheng, R Chen, YL Xu, GZ Wang, YM Xi, D Shen, J Jin and JF Wang. (2008). Proteomic analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells transduced with human telomerase reverse transcriptase gene during proliferation. *Cell Proliferation* 41:625-644.
 33. Simonsen JL, C Rosada, N Serakinci, J Justesen, K Stenderup, SIS Rattan, TG Jensen and M Kassem. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nature Biotechnology* 20:592-596.
 34. Wei LL, K Gao, PQ Liu, XF Lu, SF Li, JQ Cheng, YP Li and YR Lu. (2008). Mesenchymal stem cells from Chinese Guizhou minipig by hTERT gene transfection. *Transplantation Proceedings* 40:547-550.
 35. Cudre-Mauroux C, T Occhiodoro, S Konig, P Salmon, L Bernheim and D Trono. (2003). Lentivector-mediated transfer of Bmi-1 and telomerase in muscle satellite cells yields a Duchenne myoblast cell line with long-term genotypic and phenotypic stability. *Human Gene Therapy* 14:1525-1533.
 36. Haga K, S Ohno, T Yugawa, M Narisawa-Saito, M Fujita, M Sakamoto, DA Galloway and T Kiyono. (2007). Efficient immortalization of primary human cells by p16(INK4a)-specific short hairpin RNA or Bmi-1, combined with introduction of hTERT. *Cancer Science* 98:147-154.

37. Mori T, T Kiyono, H Imabayashi, Y Takeda, K Tsuchiya, S Miyoshi, H Makino, K Matsumoto, H Saito, S Ogawa, M Sakamoto, J Hata and A Umezawa. (2005). Combination of hTERT and bmi-1, E6, or E7 induces prolongation of the life span of bone marrow stromal cells from an elderly donor without affecting their neurogenic potential. *Mol Cell Biol* 25:5183-95.
38. Zhang X, Y Soda, K Takahashi, Y Bai, A Mitsuru, K Igura, H Satoh, S Yamaguchi, K Tani, A Tojo and TA Takahashi. (2006). Successful immortalization of mesenchymal progenitor cells derived from human placenta and the differentiation abilities of immortalized cells. *Biochem Biophys Res Commun* 351:853-9.
39. Hung SC, DM Yang, CF Chang, RJ Lin, JS Wang, LLT Ho and WK Yang. (2004). Immortalization without neoplastic transformation of human mesenchymal stem cells by transduction with HPV16 E6/E7 genes. *International Journal of Cancer* 110:313-319.
40. Chen TS, F Arslan, Y Yin, SS Tan, RC Lai, ABH Choo, J Padmanabhan, CN Lee, DPV de Kleijn and SK Lim. (2011). Enabling a robust scalable manufacturing process for therapeutic exosomes through oncogenic immortalization of human ESC-derived MSCs. *Journal of Translational Medicine* 9.
41. Simons M and G Raposo. (2009). Exosomes--vesicular carriers for intercellular communication. *Curr Opin Cell Biol* 21:575-81.
42. Greening DW, SK Gopal, R Xu, RJ Simpson and W Chen. (2015). Exosomes and their roles in immune regulation and cancer. *Semin Cell Dev Biol* 40:72-81.
43. Gyorgy B, TG Szabo, M Pasztoi, Z Pal, P Misjak, B Aradi, V Laszlo, E Pallinger, E Pap, A Kittel, G Nagy, A Falus and EI Buzas. (2011). Membrane

vesicles, current state-of-the-art: emerging role of extracellular vesicles. *Cellular and Molecular Life Sciences* 68:2667-2688.

44. Thery C, M Ostrowski and E Segura. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology* 9:581-593.
45. Lotvall J, AF Hill, F Hochberg, EI Buzas, D Di Vizio, C Gardiner, YS Gho, IV Kurochkin, S Mathivanan, P Quesenberry, S Sahoo, H Tahara, MH Wauben, KW Witwer and C Thery. (2014). Minimal experimental requirements for definition of extracellular vesicles and their functions: a position statement from the International Society for Extracellular Vesicles. *J Extracell Vesicles* 3:26913.
46. Blanchard N, D Lankar, F Faure, A Regnault, C Dumont, G Raposo and C Hivroz. (2002). TCR activation of human T cells induces the production of exosomes bearing the TCR/CD3/zeta complex. *Journal of Immunology* 168:3235-3241.
47. Wahlgren J, TDL Karlson, P Glader, E Telemo and H Valadi. (2012). Activated Human T Cells Secrete Exosomes That Participate in IL-2 Mediated Immune Response Signaling. *Plos One* 7:e49723.
48. Osteikoetxea X, A Balogh, K Szabo-Taylor, A Nemeth, TG Szabo, K Paloczi, B Sodar, A Kittel, B Gyoergy, E Pallinger, J Matko and EI Buzas. (2015). Improved Characterization of EV Preparations Based on Protein to Lipid Ratio and Lipid Properties. *Plos One* 10: UNSP e0121184
49. Raposo G and W Stoorvogel. (2013). Extracellular vesicles: Exosomes, microvesicles, and friends. *Journal of Cell Biology* 200:373-383.
50. Simpson RJ, H Kalra and S Mathivanan. (2012). ExoCarta as a resource for exosomal research. *J Extracell Vesicles* 1:18374.

51. Yanez-Mo M, PRM Siljander, Z Andreu, AB Zavec, FE Borrás, EI Buzas, K Buzas, E Casal, F Cappello, J Carvalho, E Colas, A Cordeiro-da Silva, S Fais, JM Falcon-Perez, IM Ghobrial, B Giebel, M Gimona, M Graner, I Gursel, M Gursel, NHH Heegaard, A Hendrix, P Kierulf, K Kokubun, M Kosanovic, V Kralj-Iglic, EM Kramer-Albers, S Laitinen, C Lasser, T Lener, E Ligeti, A Line, G Lipps, A Llorente, J Lotvall, M Mancek-Keber, A Marcilla, M Mittelbrunn, I Nazarenko, ENM Nolte-t' Hoen, TA Nyman, L O'Driscoll, M Olivan, C Oliveira, E Pallinger, HA del Portillo, J Reventos, M Rigau, E Rohde, M Sammar, F Sanchez-Madrid, N Santarem, K Schallmoser, MS Ostendorf, W Stoorvogel, R Stukelj, SG Van der Grein, MH Vasconcelos, MHM Wauben and O De Wever. (2015). Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* 4: 27066
52. El Andaloussi S, I Maeger, XO Breakefield and MJA Wood. (2013). Extracellular vesicles: biology and emerging therapeutic opportunities. *Nature Reviews Drug Discovery* 12:348-358.
53. Mulcahy LA, RC Pink and DR Carter. (2014). Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* 3.
54. Fierabracci A, A Del Fattore, R Luciano, M Muraca, A Teti and M Muraca. (2015). Recent Advances in Mesenchymal Stem Cell Immunomodulation: The Role of Microvesicles. *Cell Transplantation* 24:133-149.
55. Bruno S, MC Deregibus and G Camussi. (2015). The secretome of mesenchymal stromal cells: Role of extracellular vesicles in immunomodulation. *Immunol Lett* 168:154-158.
56. Ortiz LA, F Gambelli, C McBride, D Gaupp, M Baddoo, N Kaminski and DG Phinney. (2003). Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proceedings*

of the National Academy of Sciences of the United States of America 100:8407-8411.

57. Rojas M, JG Xu, CR Woods, AL Mora, W Spears, J Roman and KL Brigham. (2005). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* 33:145-152.
58. Kidd S, E Spaeth, JL Dembinski, M Dietrich, K Watson, A Klopp, VL Battula, M Weil, M Andreeff and FC Marini. (2009). Direct Evidence of Mesenchymal Stem Cell Tropism for Tumor and Wounding Microenvironments Using In Vivo Bioluminescent Imaging. *Stem Cells* 27:2614-2623.
59. Alm JJ, HMA Koivu, TJ Heino, TA Hentunen, S Laitinen and HT Aro. (2010). Circulating Plastic Adherent Mesenchymal Stem Cells in Aged Hip Fracture Patients. *Journal of Orthopaedic Research* 28:1634-1642.
60. Deng J, ZM Zou, TL Zhou, YP Su, GP Ai, JP Wang, H Xu and SW Dong. (2011). Bone marrow mesenchymal stem cells can be mobilized into peripheral blood by G-CSF in vivo and integrate into traumatically injured cerebral tissue. *Neurological Sciences* 32:641-651.
61. Ponte AL, E Marais, N Gallay, A Langonne, B Delorme, O Herault, P Charbord and J Domenech. (2007). The in vitro migration capacity of human bone marrow mesenchymal stem cells: Comparison of chemokine and growth factor chemotactic activities. *Stem Cells* 25:1737-1745.
62. Wynn RF, CA Hart, C Corradi-Perini, L O'Neill, CA Evans, JE Wraith, LJ Fairbairn and I Bellantuono. (2004). A small proportion of mesenchymal stem cells strongly expresses functionally active CXCR4 receptor capable of promoting migration to bone marrow. *Blood* 104:2643-2645.

63. Lai RC, RWY Yeo, KH Tan and SK Lim. (2013). Exosomes for drug delivery - a novel application for the mesenchymal stem cell. *Biotechnology Advances* 31:543-551.
64. Millard SM and NM Fisk. (2013). Mesenchymal stem cells for systemic therapy: Shotgun approach or magic bullets? *Bioessays* 35:173-182.
65. Bruno S, C Grange, MC Deregibus, RA Calogero, S Saviozzi, F Collino, L Morando, A Busca, M Falda, B Bussolati, C Tetta and G Camussi. (2009). Mesenchymal Stem Cell-Derived Microvesicles Protect Against Acute Tubular Injury. *Journal of the American Society of Nephrology* 20:1053-1067.
66. Collino F, MC Deregibus, S Bruno, L Sterpone, G Aghemo, L Viltono, C Tetta and G Camussi. (2010). Microvesicles Derived from Adult Human Bone Marrow and Tissue Specific Mesenchymal Stem Cells Shuttle Selected Pattern of miRNAs. *Plos One* 5:e11803.
67. Lai RC, SS Tan, BJ Teh, SK Sze, F Arslan, DP de Kleijn, A Choo and SK Lim. (2012). Proteolytic Potential of the MSC Exosome Proteome: Implications for an Exosome-Mediated Delivery of Therapeutic Proteasome. *Int J Proteomics* 2012:971907.
68. Kim HS, DY Choi, SJ Yun, SM Choi, JW Kang, JW Jung, D Hwang, KP Kim and DW Kim. (2012). Proteomic Analysis of Microvesicles Derived from Human Mesenchymal Stem Cells. *Journal of Proteome Research* 11:839-849.
69. Rani S, AE Ryan, MD Griffin and T Ritter. (2015). Mesenchymal Stem Cell-derived Extracellular Vesicles: Toward Cell-free Therapeutic Applications. *Molecular Therapy* 23:812-823.

70. Katsuda T, N Kosaka, F Takeshita and T Ochiya. (2013). The therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived extracellular vesicles. *Proteomics* 13:1637-1653.
71. Lavoie JR and M Rosu-Myles. (2013). Uncovering the secretes of mesenchymal stem cells. *Biochimie* 95:2212-2221.
72. Baglio SR, DM Pegtel and N Baldini. (2012). Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Frontiers in Physiology* 3:359.
73. Han C, X Sun, L Liu, H Jiang, Y Shen, X Xu, J Li, G Zhang, J Huang, Z Lin, N Xiong and T Wang. (2016). Exosomes and Their Therapeutic Potentials of Stem Cells. *Stem Cells International* 2016:7653489.
74. Sheng HM, Y Wang, YQ Jin, QY Zhang, Y Zhang, L Wang, B Shen, S Yin, W Liu, L Cui and NL Li. (2008). A critical role of IFN gamma in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Research* 18:846-857.
75. Xue Q, XY Luan, YZ Gu, HY Wu, GB Zhang, GH Yu, HT Zhu, MY Wang, WL Dong, YJ Geng and XG Zhang. (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 and Development* 19:27-37.
76. Wang L, Y Zhao and S Shi. (2012). Interplay between Mesenchymal Stem Cells and Lymphocytes: Implications for Immunotherapy and Tissue Regeneration. *Journal of Dental Research* 91:1003-1010.
77. Akiyama K, C Chen, DD Wang, XT Xu, CY Qu, T Yamaza, T Cai, WJ Chen, LY Sun and ST Shi. (2012). Mesenchymal-Stem-Cell-Induced

Immunoregulation Involves FAS-Ligand-/FAS-Mediated T Cell Apoptosis. *Cell Stem Cell* 10:544-555.

78. Na T, J Liu, KH Zhang, M Ding and BZ Yuan. (2015). The Notch Signaling Regulates CD105 Expression, Osteogenic Differentiation and Immunomodulation of Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells. *Plos One* 10:e0118168.
79. Gur-Wahnon D, Z Borovsky, S Beyth, M Liebergall and J Rachmilewitz. (2007). Contact-dependent induction of regulatory antigen-presenting cells by human mesenchymal stem cells is mediated via STAT3 signaling. *Experimental Hematology* 35:426-433.
80. Blazquez R, FM Sanchez-Margallol, O de la Rose, W Dalemans, V Alvarez, R Tarazone and JG Casadol. (2014). Immunomodulatory potential of human adipose mesenchymal stem cells derived exosomes on in vitro stimulated T cells. *Frontiers in Immunology* 5:556.
81. Conforti A, M Scarsella, N Starc, E Giorda, S Biagini, A Proia, R Carsetti, F Locatelli and ME Bernardo. (2014). Microvesicles Derived from Mesenchymal Stromal Cells Are Not as Effective as Their Cellular Counterpart in the Ability to Modulate Immune Responses In Vitro. *Stem Cells and Development* 23:2591-2599.
82. Zhang B, Y Yin, RC Lai, SS Tan, ABH Choo and SK Lim. (2014). Mesenchymal Stem Cells Secrete Immunologically Active Exosomes. *Stem Cells and Development* 23:1233-1244.
83. Di Trapani M, G Bassi, M Midolo, A Gatti, PT Kanga, A Cassaro, R Carusone, A Adamo and M Krampera. (2016). Differential and transferable modulatory effects of mesenchymal stromal cell-derived extracellular vesicles on T, B and NK cell functions. *Scientific Reports* 6.

84. Budoni M, A Fierabracci, R Luciano, S Petrini, V Di Ciommo and M Muraca. (2013). The Immunosuppressive Effect of Mesenchymal Stromal Cells on B Lymphocytes Is Mediated by Membrane Vesicles. *Cell Transplantation* 22:369-379.
85. Gyorgy B, K Modos, E Pallinger, K Paloczi, M Pasztoi, P Misjak, MA Deli, A Sipos, A Szalai, I Voszka, A Polgar, K Toth, M Csete, G Nagy, S Gay, A Falus, A Kittel and EI Buzas. (2011). Detection and isolation of cell-derived microparticles are compromised by protein complexes resulting from shared biophysical parameters. *Blood* 117:E39-E48.
86. de Vrij J, SLN Maas, M van Nispen, M Sena-Esteves, RWA Limpens, AJ Koster, S Leenstra, ML Lamfers and MLD Broekman. (2013). Quantification of nanosized extracellular membrane vesicles with scanning ion occlusion sensing. *Nanomedicine* 8:1443-1458.
87. Lacroix R, C Judicone, M Mooberry, M Boucekine, NS Key, F Dignat-George and IS Workshop. (2013). Standardization of pre-analytical variables in plasma microparticle determination: results of the International Society on Thrombosis and Haemostasis SSC Collaborative workshop. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 11:1190-1193.
88. Dang S, ZM Yu, CY Zhang, J Zheng, KL Li, Y Wu, LL Qian, ZY Yang, XR Li, Y Zhang and RX Wang. (2015). Autophagy promotes apoptosis of mesenchymal stem cells under inflammatory microenvironment. *Stem Cell Res Ther* 6:247.
89. Ma S, N Xie, W Li, B Yuan, Y Shi and Y Wang. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation* 21:216-225.
90. Bernardo ME and WE Fibbe. (2013). Mesenchymal Stromal Cells: Sensors and Switchers of Inflammation. *Cell Stem Cell* 13:392-402.

91. de Candia P, V De Rosa, M Casiraghi and G Matarese. (2016). Extracellular RNAs: a secret arm of immune system regulation. *J Biol Chem* 291:7221-7228.
92. McCoy-Simandle K, SJ Hanna and D Cox. (2016). Exosomes and nanotubes: Control of immune cell communication. *Int J Biochem Cell Biol* 71:44-54.
93. Mokarizadeh A, N Delirez, A Morshedi, G Mosayebi, A-A Farshid and K Mardani. (2012). Microvesicles derived from mesenchymal stem cells: Potent organelles for induction of tolerogenic signaling. *Immunology Letters* 147:47-54.
94. Cho JA, H Park, EH Lim and KW Lee. (2012). Exosomes from breast cancer cells can convert adipose tissue-derived mesenchymal stem cells into myofibroblast-like cells. *International Journal of Oncology* 40:130-138.
95. Sowinski S, C Jolly, O Berninghausen, MA Purbhoo, A Chauveau, K Koehler, S Oddos, P Eissmann, FM Brodsky, C Hopkins, B Oenfelt, Q Sattentau and DM Davis. (2008). Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission. *Nature Cell Biology* 10:211-219.
96. Davis DM and S Sowinski. (2008). Membrane nanotubes: dynamic long-distance connections between animal cells. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 9:431-436.
97. Figeac F, PF Lesault, O Le Coz, T Damy, R Souktani, C Trebeau, A Schmitt, J Ribot, R Mounier, A Guguin, C Manier, M Surenaud, L Hittinger, JL Dubois-Rande and AM Rodriguez. (2014). Nanotubular Crosstalk with Distressed Cardiomyocytes Stimulates the Paracrine Repair Function of Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells* 32:216-230.

98. Bai L, DP Lennon, V Eaton, K Maier, AI Caplan, SD Miller and RH Miller. (2009). Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells Induce Th2-Polarized Immune Response and Promote Endogenous Repair in Animal Models of Multiple Sclerosis. *Glia* 57:1192-1203.
99. Imberti B, M Morigi and A Benigni. (2011). Potential of mesenchymal stem cells in the repair of tubular injury. *Kidney International Supplements* 1:90-93.
100. Dimri GP, JL Martinez, JJ Jacobs, P Keblusek, K Itahana, M Van Lohuizen, J Campisi, DE Wazer and V Band. (2002). The Bmi-1 oncogene induces telomerase activity and immortalizes human mammary epithelial cells. *Cancer Res* 62:4736-45.
101. Wang J, LY Xie, S Allan, D Beach and GJ Hannon. (1998). Myc activates telomerase. *Genes Dev* 12:1769-74.
102. Park IK, SJ Morrison and MF Clarke. (2004). Bmi1, stem cells, and senescence regulation. *J Clin Invest* 113:175-9.
103. Simonsen JL, C Rosada, N Serakinci, J Justesen, K Stenderup, SI Rattan, TG Jensen and M Kassem. (2002). Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. *Nat Biotechnol* 20:592-6.
104. Terai M, T Uyama, T Sugiki, XK Li, A Umezawa and T Kiyono. (2005). Immortalization of human fetal cells: the life span of umbilical cord blood-derived cells can be prolonged without manipulating p16INK4a/RB braking pathway. *Mol Biol Cell* 16:1491-9.
105. Serakinci N, P Guldborg, JS Burns, B Abdallah, H Schrodder, T Jensen and M Kassem. (2004). Adult human mesenchymal stem cell as a target for neoplastic transformation. *Oncogene* 23:5095-5098.

106. Yamaoka E, E Hiyama, Y Sotomaru, Y Onitake, I Fukuba, T Sudo, T Sueda and K Hiyama. (2011). Neoplastic transformation by TERT in FGF-2-expanded human mesenchymal stem cells. *Int J Oncol* 39:5-11.
107. Charbord P. (2010). Bone marrow mesenchymal stem cells: historical overview and concepts. *Hum Gene Ther* 21:1045-56.
108. Serakinci N, SF Hoare, M Kassem, SP Atkinson and WN Keith. (2006). Telomerase promoter reprogramming and interaction with general transcription factors in the human mesenchymal stem cell. *Regen Med* 1:125-31.
109. Huang GP, ZJ Pan, JP Huang, JF Yang, CJ Guo, YG Wang, Q Zheng, R Chen, YL Xu, GZ Wang, YM Xi, D Shen, J Jin and JF Wang. (2008). Proteomic analysis of human bone marrow mesenchymal stem cells transduced with human telomerase reverse transcriptase gene during proliferation. *Cell Prolif* 41:625-44.
110. Saito M, K Handa, T Kiyono, S Hattori, T Yokoi, T Tsubakimoto, H Harada, T Noguchi, M Toyoda, S Sato and T Teranaka. (2005). immortalization of cementoblast progenitor cells with Bmi-1 and TERT. *J Bone Miner Res* 20:50-7.

10. Saját közlemények jegyzéke

10.1 A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

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

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

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

10.2 A disszertációtól független közlemények:

Dóra Mihály, **Zsolt Matula**, Yi-Che Changchien, Gergő Papp, Péter Tátrai, Zoltán Sági: *First cloned human immortalized adipose derived mesenchymal stem-cell line with chimeric SS18-SSX1 gene (SS-iASC)*. *Cancer Genetics*; 216-217: pp. 52-60. (2017) **(IF: 1,93)**

Zsuzsanna Nerada, Zoltán Hegyi, Áron Szepesi, Szilárd Tóth, Csilla Hegedüs, György Várady, **Zsolt Matula**, László Homolya, Balázs Sarkadi, Ágnes Telbisz: *Application of*

fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. Cytometry Part A; 89:826-34 (2016) **(IF: 3.222)**

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

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

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

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

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

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

11. Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, Suhajdáné Dr. Urbán Veronikának és Dr. Uher Ferenc professzor úrnak szeretném megköszönni, hogy PhD tanulmányaim során végig segítettek munkámat, és a gyakran felmerülő nehézségek ellenére végig lelkiismeretesen, fáradtságot nem ismerve kitartottak mellettem. Köszönöm társtémavezetőmnek, Dr. Tátrai Péternek is kitartó munkáját és felelősség vállalását, aki egyetemi tanulmányaim során példaértékű hozzáállást tanúsított témavezetőmként, valamint a PhD tanulmányaim kezdetén is mindenben számíthattam rá.

Külön köszönettel tartozom Dr. Német Katalinnak, aki egyetemi tanulmányaim során bevezetett az őssejtbiológia rejtelseibe és mindvégig kitartóan, lelkiismeretesen segítette munkámat, szakmai és személyes tanácsaira a mai napig számíthatok. Köszönettel tartozom Szigeti Anna, Bakki Margit és Bátkai Mónika asszisztenseknek is fáradhatatlan, precíz munkájukért, valamint Dr. Szepesi Áronnak is, akitől rengeteg dolgot tanultam, és mindig számíthattam rá. Önzetlen segítségükért köszönet illeti Dr. Sarkadi Balázs professzor urat, Dr. Apáti Ágotát és Dr. Brózik Anna kollégáimat is.

Szeretném megköszönni kollaboráló partnereimnek is a szakmai segítséget, Németh Andreának és Dr. Buzás Edit professzor asszonynak (Semmelweis Egyetem Genetikai, Sejt- és Immunbiológiai Intézet), Lőrincz Péternek és Dr. Lőw Péternek (Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék – ELTE).

Végezetül a legnagyobb köszönettel feleségemnek, Matula-Péntek Adriennek, kisfiamnak, Gergőnek és szüleimnek tartozom végtelen türelmükért és támogatásukért.