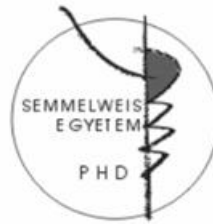


# A mesenchymalis őssejtek szerepe az immunválasz szabályozásában

Doktori tézisek

**Hegyi Beáta**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Habil Uher Ferenc tudományos főmunkatárs, a biol. tud. kandidátusa

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

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Budás Edit intézetvezető  
egyetemi tanár

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

Budapest  
2013



## Bevezetés

A mesenchymalis ősz- vagy stroma sejtek (röviden MSC-k) olyan multipotens szöveti őssejtek, amelyek az egész szervezetben fellelhetőek és fontos szerepet játszanak több szerv/szövet önfenntartásában és regenerációjában, de hatással vannak a vérképzésre és az immunválasz folyamataira is.

Az MSC-k terápiás szempontból talán legígéretesebb tulajdonsága immunszuppresszív sajátosságuk, hiszen mind a veleszületett, mind pedig az adaptív immunrendszer sejtjeinek érését, aktivációját, proliferációját és/vagy differenciációját képesek gátolni, ezzel pedig funkcionálisan válaszképtelen állapotba juttatják azokat. Ehhez társul kifejezett hipo-immunogenitásuk mellett a sérült és/vagy gyulladással járó folyamatok következtében károsodott szövetek endogén regenerációját támogató képességük is. Ezen tulajdonságok összessége teszi az MSC-eket ígéretessé olyan autoimmun kórképek kezelésére, mint pl. a graft versus host betegség, az egyes típusú diabetes, a systemás lupus erythematosus vagy a sclerosis multiplex. Az ezen a területen *in vitro* és *in vivo* állatkísérleti rendszerekben nyert biztató eredmények és a klinikai kipróbálások során szerzett tapasztalatok összessége alapján kijelenthető, hogy az MSC-k terápiás célú felhasználása az elkövetkező évtizedekben jó eséllyel hozhat áttörést az autoimmun betegségek kezelésében.

Ehhez azonban nagyon fontos lenne az immunszuppresszió és szövetregeneráció támogatás hátterében álló molekuláris mechanizmusok alapos megismerése és megértése, valamint az esetlegesen felmerülő kockázati tényezők (mint pl. a daganatnövekedés és áttét képzés támogatásának) feltérképezése. Munkánkkal ehhez szeretnénk hozzájárulni.

## Célkitűzések

A következő kérdésekre szerettünk volna választ kapni:

- 1) Izolálhatók-e a csontvelőből ismert MSC-khez hasonló őssejtek más testtájokról, úgymint hasi zsírszövetből, a thymusból, a lépből és az aortából is?
- 2) A különböző szervekből származó MSC-k hasonló immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek-e?
- 3) Milyen szolúbilis jelátvivő anyagok játszanak szerepet az MSC-k immunszuppresszív aktivitásában?
- 4) Hogyan befolyásolják a legfontosabb gyulladásozó citokinek – TNF- $\alpha$  és IFN- $\gamma$  - a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2 (PGE2) termelését?
- 5) Milyen egyéb mechanizmusok játszanak szerepet a mesenchymalis őssejtek PGE2 termelésének szabályozásában?
- 6) Alkalmask-e az MSC-k a kísérletes autoimmun encephalomyelitis kezelésére?
- 7) Az MSC-k jelenléte hogyan befolyásolja a mikroglia sejtek morfológiáját, fagocitózist, citokin termelését illetve antigén prezentáló képességét, azaz aktiváltsági állapotát (polarizációját)?
- 8) Bakteriális endotoxin (LPS) jelenléte hogyan befolyásolja az MSC-k mikrogliaira gyakorolt hatását?
- 9) Milyen jelátviteli rendszerek játszanak szerepet a mesenchymalis őssejtek és mikroglia sejtek kölcsönhatásában?

## **Módszerek**

### ***Mesenchymalis őssejtek izolálása, tenyésztése és jellemzése***

A mesenchymalis őssejtek izolálásakor plasztik-adherenciájukat használtuk ki. C57Bl/6 egerek combcsontjait izoláltunk, majd a velőűrt fecskendőbe felszívott médiummal öblítettük át. Az így nyert sejtszuszpenziót négyzetcentiméterenként  $2-5 \times 10^6$  sejtszámban  $25 \text{ cm}^2$ -es tenyésztőedényekbe szélesztettük komplett médiumban. A hasi és ágyéki zsírszövet mintákat mechanikai feltárást követően 0.1% kollagenáz tartalmú PBS-ben,  $37^\circ\text{C}$ -on 30 percen át emésztettük majd mosást követően - az előzőekben leírtak szerint - komplett médiumba szélesztettük. A tenyészeteket  $37^\circ\text{C}$ -on  $\text{CO}_2$ -termosztátban inkubáltuk, a le nem tapadt sejteket a médium heti kétszeri cseréjével távolítottuk el.

Az összefüggő, adherens sejtréteget 0.25%-os tipszin/EDTA oldattal választottuk el a tenyésztőedény falától és  $75\text{-cm}^2$ -es flaskába szélesztve folytattuk a tenyésztést. A további átoltásokat is a fent leírtak szerint végeztük el. Kísérleteinkhez 8-15-ször átoltott MSC-eket használtunk.

Az MSC-k jellemzésekor sejtfelszíni markereiket az adott fehérjére specifikus monoklonális ellenanyagokkal történt jelölést követően áramlási citometria segítségével határoztuk meg. Adipocyta és osteoblast irányú differenciáltatásukat a megfelelő induktor médiumokban végeztük el.

### ***T-sejt proliferáció gátlása***

Az immunszuppresszív aktivitás vizsgálatához az előzetesen kitapasztott MSC-khez  $2 \times 10^5$  lépsejtet, vagy izolált lép T-sejtet adtunk  $5 \mu\text{g/ml}$  concanavalin A (ConA) egyidejű jelenlétében, vagy anélkül.

A kevert limfocita kultúrákat (MLR)  $2 \times 10^5$  responder (C57Bl/6) és  $2 \times 10^5$  stimulátor lépsejt összemérésével készítettük el. Két, vagy MLR esetén négy nap inkubáció után  $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-timidinnel}$  jelöljük a sejteket, majd folyadékszintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot. A „trans-well” elrendezésű kísérletek során a kétféle sejtípust  $1 \mu\text{m}$  pórusátmérőjű féligáteresztő hártya segítségével térben szeparáltan tenyésztettük.

### ***Szekretált fehérjék kimutatása sejt kultúra felülúszókból***

A vizsgált citokinek mennyiségét a sejt kultúra felülúszókból vett mintákban az adott citokinre specifikus, kvantitatív Parameter™ ELISA Kit segítségével, a cég utasításait követve határoztuk meg.

### ***A mesenchymalis őssejtek in vitro stimulációja***

Az MSC-eket  $2 \times 10^5$  sejtszámban, 1 ml komplett médiumban 24 lyukú tenyésztő tálcákra szélesztettük. 24 órán elteltével gyulladáscsökkentő citokinek (TNF- $\alpha$  és IFN- $\gamma$ ), enzim-gátlószerek (Indometacin, L-NMA és metil-triptofán) nitrogén-oxid donor molekula (NOC-18) és/vagy lipopoliszacharid (LPS) hozzáadása után további 48 órán keresztül tenyésztettük a sejteket. A felülúszókból mintákat vettünk, amelyeket  $-80^\circ\text{C}$  -ra fagyasztva tároltunk.

### ***A kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) betegségmodell indukciója és követése***

12 hetes nőstény C57Bl/6 egereket  $5 \text{ mg/ml}$  elölt Mycobacterium tuberculosis tartalmú komplett Freund adjuváns (CFA) és  $1 \text{ mg/ml}$  MOG<sub>35-55</sub> peptid tartalmú PBS oldat 1:1 arányú keverékével oltottuk be subcutan. Az indukció napján, valamint 2 nap elteltével az állatoknak  $330 \mu\text{g}$  Pertussis toxint is adtunk intraperitoneálisan. A 7. napon véletlenszerűen kiválasztott minden második állatot  $2 \times 10^6$  mesenchymalis őssejtet intraperitoneális beadásával kezeltünk.

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

0 pont: egészséges állat;

1 pont: az állat a lebénult farkát járás közben maga után húzza;

2 pont: az állat hátsó lábainak mozgása bizonytalanná válik vagy az egyik hátsó végtagja bénult;

3 pont: az állat mindkét hátsó végtagja lebénult;

4 pont: az állat mellső lábainak mozgása is bizonytalanná válik, vagy az egyik mellső végtagja bénult;

5 pont: az állat minden végtagja bénult vagy az állat elhalálozott.

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

### ***Kevert glia kultúrák készítése és mikroglia sejtek izolálása***

Újszülött (P1-P3) CD1 egerek agyvelejét izoláltuk, az agyhártyák eltávolítása után mechanikailag feltártuk a szövetet és 0,05% tripszin tartalmú PBS-ben enzimatikusan emésztettük. A kinyert sejteket poly-L-lizinnel (PLL) bevont felületre szélesztettük komplett médiumban. 24 és 48 óra múlva a le nem tapadt sejteket alapos mosással távolítottuk el, majd a sejt kultúrákat 3 hétig tenyésztettük heti kétszeri médiumcsere mellett.

Az érett kultúrából a 21. napon mikroglia sejteket izoláltunk: a tenyészeteket 2 órán át inkubáltuk 0.05%-os EDTA mentes tripszin oldatban, majd a felvált astroglia réteg eltávolítása után a letapadva maradt sejteket további 10 percig 0.25%-os tripszin/EDTA oldattal emésztettük. Az ily módon szelektíven izolált mikroglia sejteket mosás és centrifugálás után PLL-el bevont felszínre tapaszttuk ki.

### ***Mikroglia sejtek morfológiai analízise (immuncitokémia)***

$10^5$  mikroglia sejtet inkubáltunk  $37^\circ\text{C}$ -on 48 órán keresztül  $10^4$  csontvelői eredetű MSC és/vagy  $10\ \mu\text{g/ml}$  LPS jelenlétében vagy a nélkül. Paraformaldehides fixálást követően a sejteket egy éjszakán át  $4^\circ\text{C}$ -on biotinált Isolectin B4-gyel jelöltük, majd Alexa 488-cal konjugáltatott avidint adtunk hozzájuk. Mintánként ( $n=4$ ) 15 egymástól független, random látótérről készítettünk felvételeket Nikon A1R konfokális lézer-szkenning mikroszkóp 20-szoros objektívjével. A képeken az egyes sejtek területét Zeiss AxioVision 4.8 szoftver segítségével mértük meg.

### ***Mikroglia sejtek fagocitózisának vizsgálata***

$5 \times 10^6$  forralással előlt élesztősejtet adtunk a mikroglia sejteket és/vagy MSC-ket tartalmazó kultúrákhoz, majd egy órán keresztül inkubáltuk őket  $37^\circ\text{C}$ -on. Háromszori alapos PBS-es mosást követően fixáltuk és Giemsa oldattal festettük a preparátumokat. Mintánként 10 egymástól független, random látótérről készítettünk felvételeket, majd meghatároztuk a sejtenként bekebelezett élesztő partikulumok számát ( $n=100$ ).

Az apoptotizáló thymocyták fagocitózisának vizsgálatához felnőtt C57Bl/6 egerek thymusát izoláltuk és a szervet mechanikailag feltártuk. Az  $5 \times 10^6/\text{ml}$  thymocytát tartalmazó szuszpenzióhoz  $1\ \mu\text{M}$  dexametazont adtunk, majd 12 órán át  $37^\circ\text{C}$ -on inkubáltuk.

Az élesztő sejtek és apoptotizáló thymocyták fagocitózisát követő citokin termelésbeli változások vizsgálatához a mikroglia sejteket és/vagy MSC-ket tartalmazó lyukakba  $5 \times 10^6$  élesztő sejtet vagy apoptotizáló thymocytát mértünk, majd egy órán keresztül inkubáltuk őket  $37^\circ\text{C}$ -on. Háromszori alapos PBS-es mosást követően további 48 órán keresztül tenyésztettük őket, majd a felülúszókból mintákat vettünk, amelyeket ezt követően a szekretált fehérjék kimutatásáig  $-80^\circ\text{C}$ -ra fagyaszttva tároltunk.



### ***Mikroglia sejtek antigén prezentáló képességének mérése***

Az ovalbumin specifikus T sejtek izolálásának előkészítéseként 10-12 hetes C57Bl/6 egereket oltottunk subcutan komplett Freund adjuváns és 2 mg/ml koncentrációjú ovalbumin oldat 1:1 arányú keverékével. Egy hét elteltével az előkezelt állatok nyirokcsomóit izoláltuk, majd Hanks-féle oldatban mechanikailag feltártuk azokat. Centrifugálást követően a komplett médiumban reszuszpendált T limfocitákat a mikroglia sejteket (mint antigén prezentáló sejteket) és mesenchymalis őssejteket is tartalmazó kultúrákhoz adtuk hozzá. 4 napos inkubáció után 1  $\mu$ Ci 3H-timidin hozzáadásával 6 órán keresztül jelöltük a mintákat, majd learattuk azokat és folyadékszcintillátorban mértük a percnkénti beütésszámot.

### ***Kvantitatív real-time PCR***

A mikroglia és MSC sejtek kultúrákba kerülését, illetve az LPS kezelést követő 5. órában Trizolos feltárást végeztünk. Az RNS-ek izolálásához és tisztításához GeneAid Total RNA mini Kit-et használtunk, a preparátumok tisztaságát Nano Drop spektrofotométerrel ellenőriztük. Az cDNS-re való átírás High-capacity cDNA reverse transcription kittel történt. A real-time PCR-t Power SYBR Green PCR Master Mix segítségével kivitelezttük ABI StepOne készüléken, a gyártó utasításait követve. A reakciók során használt primereket Primer Express 3.0 programmal terveztük meg. A GAPDH-nál mért értékeket használtuk belső kontrollként. A „melting curve analízist” és a génexpressziós eredmények kiértékelését ABI StepOne készülék saját szoftverének (v.2.0) segítségével végeztük el.

### ***Statisztika***

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

## **Eredmények**

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

Felnőtt C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből valamint hasi és lágyéki zsírszövetéből stroma tenyészeteket készítettünk. A 8. átoltás után a csontvelői (Csv-MSc) és a zsírszövet eredetű (Zs-MSc) mesenchymalis őssejt tenyészetek egyaránt adherens, fibroblast-szerű morfológiát mutató sejtekből álltak. Áramlási citometriás vizsgálataink eredménye szerint ezek a sejtpopulációk Sca-1, CD44 és CD73 markerekre pozitívak voltak, míg a CD90.2-t kizárólag a zsírszövet eredetű sejtek expresszáltak. Tenészetek egyöntetűen negatívnak bizonyultak a vizsgált haematopoetikus markerekre. Mindkét MSc populáció sejtjei megfelelő induktorok hatására osteoblast, illetve adipocita irányba differenciálódtak. Tehát a felnőtt egerek csontvelőjéből és zsírszövetéből izolált sejttenyészetek morfológiájukat, sejtfelszíni markereiket és differenciációs képességük alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők. Hasonlóképpen minden kritériumnak megfelelő MSc populációkat nyerhetünk fiatal (14 napos) C57Bl/6 egerek csontvelőjéből, aortafalából, lépéből és thymusából is.

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

A felnőtt állatok csontvelőjéből és zsírszövetéből származó, valamint a fiatal egerek csontvelői és lép eredetű MSc-i erősen (kb. 65-70%-ban) képesek gátolni a T limfociták mitogén (ConA) indukálta proliferációját, az aorta fal eredetű MSc-k gátló aktivitása ennél mérsékeltebb (kb. 40%-os), míg a thymus eredetű sejtek egyáltalán nem képesek a T-sejtek osztódást befolyásolni. Ezzel teljesen megegyező eredményt kaptunk kevert limfocita kultúrákban.

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

### ***3. Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása különböző enzim gátlók jelenlétében***

Az MSC-kből aktivált T sejtek jelenlétében felszabaduló különböző szolubilis mediátorok szintéziséért felelős enzimek aktivitásának gátlásával próbáltuk feltárni az immunszuppresszió mechanizmusát. Indometacin (PGE<sub>2</sub> szintézis gátló) vagy L-NMA (nitrogén-oxid-szintáz gátló) jelenlétében a T sejt proliferáció részben, de nem teljesen helyreáll, tehát az immunszuppresszív aktivitásában a prosztaglandin(ok)nak és a NO-nak is szerepe van. A metil-triptofán (indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) gátlószer) viszont nem csökkenti az MSC-k proliferáció gátló képességét, vagyis az IDO – legalábbis egér MSC-k esetében – nem járul hozzá az immunszuppresszív aktivitáshoz.

### ***4. Az MSC-k PGE<sub>2</sub> termelése aktivált T sejtek jelenlétében***

A fenti eredmények figyelembe vételével a továbbiakban az MSC-k PGE<sub>2</sub> termelésének vizsgálatára fókuszáltunk. A csontvelői őssejtek alap PGE<sub>2</sub> termelése 1200 pg/ml, ez az érték naív T sejtek jelenlétében 4000 pg/ml-re nő meg. Ha ConA-val stimuláljuk a limfocitákat, akkor 16000 pg/ml PGE<sub>2</sub>-t mérhetünk a felülúszóban. Ha a T-sejteket és az Csv-MSK-eket térben elválasztottuk egymástól, akkor az őssejtek PGE<sub>2</sub> szekréciója nem emelkedett 1200 pg/ml fölé. Tehát az aktivált T limfociták képesek fokozni a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E<sub>2</sub> szintézisét, de ennek bekövetkeztéhez mindenképpen közvetlen sejt-sejt kölcsönhatás szükséges.

## **5. A gyulladós környezet hatása a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2 termelésének szabályozására**

A gyulladós környezet modellezésére Csv- és Zs-MSK tenyészetekhez rekombináns citokineket adtunk *in vitro*. A TNF- $\alpha$  magasabb, 50 ng/ml koncentrációban jelentősen fokozta az MSC-k PGE2 termelését, míg alacsonyabb (10 ng/ml) koncentrációban már hatástalannak bizonyult. Ha az MSC-khez IFN- $\gamma$ -t adtunk, egyik vizsgált koncentrációban (100 és 20 ng/ml) sem tapasztaltunk szignifikáns változást. Ugyanakkor, ha a két citokint együttesen alkalmaztuk, már alacsony koncentrációik (10 ng/ml TNF- $\alpha$  és 20 ng/ml IFN- $\gamma$ ) esetén is jelentősen megnő a szekretált PGE2 mennyisége. Így elmondhatjuk, hogy a gyulladós környezet fokozza az MSC-k immunszuppresszív mediátor termelését. A vizsgált mediátorok hatása erősen szinergisztikus, hiszen az IFN- $\gamma$  jelentősen fokozni képes a mesenchymalis őssejtek TNF- $\alpha$  indukálta PGE2 termelését.

10  $\mu$ M indometacin hozzáadása csontvelői MSC kultúrák esetén nem csak a spontán, de a gyulladós mediátorok által stimulált PGE2 szekréciót is szinte teljes egészében gátolni képes. A TNF- $\alpha$  és az IFN- $\gamma$  egyidejű jelenlétében indukált PGE2 termelés L-NMA-val is gátolható, noha csak 60-70%-osan. Ezzel szemben az 50 ng/ml koncentrációjú TNF- $\alpha$ -val stimulált PGE2 szekrécióra a NOS enzim gátlása nincs szignifikáns hatással.

## **6. Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása kísérletes autoimmun encephalomyelitisben**

Mivel az eddig bemutatott *in vitro* vizsgálati eredményeink és irodalmi adatok is arra engednek következtetni, hogy az MSC-k immunszuppresszív aktivitása terápiás célra is felhasználható, ezért az emberi sclerosis multiplex egy preklinikai állatmodelljében, a

kísérletes autoimmun encephalomyelitisben (EAE-ben) vizsgáltuk sejteink hatását.

A kontroll csoporthoz képest a 7. napon  $2 \times 10^6$  csontvelői eredetű mesenchymalis őssejt intraperitoneális beadásával kezelt egerek a betegség első fázisában, átmenetileg súlyosabb tüneteket mutatnak, ami azonban nem tekinthető szignifikánsnak. A betegség legsúlyosabb szakaszában (15-18. napon) egyáltalán nincs különbség az őssejtekkel kezelt, illetve a nem kezelt állatok bénulásának mértékében. Ezt követően (a 19. naptól) viszont a sejttérapián átesett egerekben szignifikánsan gyorsabb állapot-javulás következik be, mint kontroll társaikban. Az MSC kezelés modellünkben tehát elsősorban nem az EAE indukcióját és progresszióját gátolja, hanem sokkal inkább a betegség remisszióját segíti elő. Mivel az agy- és gerincvelőben zajló gyulladás folyamat(ok) fő effektor sejtjei EAE esetében is a mikroglia sejtek, továbbiakban a mesenchymalis őssejtek mikroglia sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálatára összpontosítottunk *in vitro* kísérleti körülmények között.

### **7. Az MSC-k mikroglia sejtekre gyakorolt hatásának vizsgálata**

Újszülött CD1 egerek agyvelejéből kevert glia tenyészeteket készítettünk, majd ezekből két lépcsős tripszinezési eljárással szelektíven izoláltunk mikroglia sejteket, amelyekre többszörösen elágazó, nyugalmi sejtalak volt jellemző. A mikroglia sejtek morfológiája MSC-k egyidejű jelenlétében jelentősen megváltozott: kiterült, aktiválódott, amőboid fenotípust vettek fel még akkor is, ha a két sejtípust félig áteresztő hártával térben elválasztottuk egymástól.

Ezután funkcionális tesztekben vizsgáltuk az MSC-k mikroglia sejtre gyakorolt hatását. Elsőként a fagocitotikus aktivitásában bekövetkező változásokat tanulmányoztuk, melyet élesztő partikulumok segítségével tudtuk kvantifikálni. Egyetlen mikroglia sejtek átlagosan  $15 \pm 1$  élesztőt kebelezett be a 60 perces inkubáció

alatt, míg mesenchymalis őssejtek jelenlétében a fagocitózis intenzitása  $24 \pm 2$ -re nőtt, amely szignifikáns különbségnek bizonyult. Tehát a mesenchymalis őssejtek jelenléte aktiválja a mikroglia sejteket, amely a sejthalak és sejtméret változásában, valamint a fagocitózis fokozódásában érhető tetten.

### **8. A mikroglia sejtek citokin termelése MSC-k jelenlétében**

A következőkben arra voltunk kíváncsiak, hogy MSC-k hatására a mikroglia sejtek milyen jellegű aktivációja történik meg, ezért összehasonlítottuk az MSC-k és az LPS mikroglia sejtek citokin termelésére gyakorolt hatását. Endotoxin jelenlétében a mikroglia sejtek TNF- $\alpha$  termelése fokozódott, míg az IL-10 és PGE2 szekrécióban nem tapasztaltunk változást, vagyis a mikroglia sejtek klasszikus aktiváción mentek keresztül és M1, gyulladásos fenotípust öltöttek. A mikroglia-MSK kokultúrák felülűszóiban azonban nagy mennyiségű IL-10 és PGE2 volt kimutatható, ami a milió immunszuppresszív irányba tolódását és M2-es, alternatív aktivációt jelez. Ha a kétféle sejtípust térben elválasztottuk egymástól transwell kultúrákban, akkor a felülűszókban csökkent a gyulladásgátló mediátorok koncentrációja, vagyis az immunszuppresszív hatás kifejtéséhez ez esetben is sejt-sejt kontaktus szükséges.

Ezután azt szeretnénk volna kideríteni, hogy az MSC-mikroglia kokultúrákban mely sejtípus termeli a fent említett pro- és anti-inflammatorikus citokineket. Két lépcsős transwell kísérletek és génexpressziós vizsgálatok együttes eredménye szerint a TNF- $\alpha$  és IL-10 zömét a mikroglia sejtek termelték, míg a mesenchymalis őssejtek csak PGE2-t szekretáltak számottevő mennyiségben.

### **9. MSC-k hatása a mikroglia sejtek antigén-bemutató képességére**

A mikroglia sejtek antigén-bemutató képességét ovalbumin (OVA)-specifikus T-sejtek és OVA különböző koncentrációinak

jelenlétében vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy a mikroglia sejtek hatékonyan prezentálták az ovalbumint, amelyet a mesenchymalis őssejtek egyidejű jelenléte még tovább fokozott. Ezt támasztja alá az a megfigyelésünk is, miszerint a mikroglia sejtek antigén-bemutató képességében kulcsszerepet játszó sejtfelszíni molekulák (MHC-II és CD86) expressziója is fokozódott MSC-k jelenlétében. Ezek alapján úgy véljük, hogy a mesenchymalis őssejtek hatására regulátor típusú alternatívan aktivált mikroglia sejtek alakulnak ki, amelyekre amoeboid sejt morfológia, intenzív fagocitózis, gyulladásgátló mediátorok termelése, valamint fokozott antigén prezentáló képesség jellemző. Ez a tény terápiás szempontból is kiemelkedő jelentőséggel bír, hiszen az esetleges őssejt-kezelés hatására megjelenő regulátor típusú mikroglia sejtek eredményesek lehetnek a kóros, autoimmun eredetű neurodegeneratív kórképek megfékezésében.

#### ***10. Az inflammaszómák szerepe a mikroglia-MSK kölcsönhatásban***

A mikroglia sejtek és a mesenchymalis sejtek közötti kölcsönhatás alaposabb vizsgálatakor több különféle mediátor (IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, Arg-1 és MCP1) génexpresszióját vizsgáltuk meg. Ezek közül kiemelném az IL-1 $\beta$ -t, amelynek kifejeződése MSC-k jelenlétében szignifikánsan csökken mikroglia sejtekben. Ez felvetette annak lehetőségét, hogy az MSC-k a mikroglia sejtek inflammaszómáin keresztül, azokra (is) hatva fejtik ki immunszuppresszív aktivitásukat. Ennek alátámasztására megvizsgáltuk a mikroglia sejtek NLRP3 expresszióját is, amely MSC-k jelenlétében a felére csökkent. Tehát az MSC-k hatékonyan képesek gátolni a gliasejtek inflammaszómák felépítésében kulcsszerepet játszó NLRP3 génjének kifejeződését és ezzel párhuzamosan csökkentik az IL-1 $\beta$  expresszióját is.

## Következtetések

1. A csontvelő mellett a zsírszövetből, thymusból, lépből és az aorta falából is sikerült olyan, fibroblast-szerű morfológiát mutató, adherens sejteket izolálnunk, amelyek felszíni markereik, valamint adipocytá és osteoblast irányú differenciálódási képességük alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők.
2. Ezek az MSC-k – a thymusból származó sejtek kivételével – gátolják a T limfociták mitogén és alloantigén-indukált osztódását *in vitro* kultúrában, vagyis hasonló immunszuppresszív aktivitással rendelkeznek.
3. A csontvelői és zsírszövet eredetű MSC-k aktivált T sejtek vagy gyulladásoos citokinek jelenlétében nagy mennyiségű prosztaglandin E2 termelésére képesek, ami potenciális immunszuppresszív mediátornak tekinthető.
4. A legfontosabb gyulladásoos citokinek – TNF- $\alpha$  és IFN- $\gamma$  - egymás hatását erősítve fokozzák a mesenchymalis őssejtek PGE2 termelését.
5. Az MSC-k PGE2 termelését nem egy kitüntetett mediátor vagy nem-redundáns molekuláris mechanizmus szabályozza, sokkal inkább több jelátviteli rendszer együttesen játszik benne szerepet.
6. Mesenchymalis őssejtek adásával eredményesen kezelhető a kísérletes autoimmun encephalomyelitis.
7. MSC-k jelenlétében a mikroglia sejtek morfológiája, élesztő fagocitózis intenzitása, citokin termelése illetve antigén prezentáló képessége jelentősen módosul. Ebből arra következtethetünk, hogy a mesenchymalis őssejtek M2 típusú vagyis alternatív aktivációt idéznek elő a mikroglia sejteken.



8. MSC-k jelenléte nem gátolja teljesen, sokkal inkább csak modulálja a klasszikus aktiváció folyamatait, amelyet a patogén(ek)ből származó antigének (mint pl. gombasejtek, endotoxinok) indítanak el.
9. Az MSC-k által termelt PGE2 lehet az egyik fontos szolubilis mediátor, amely a mikroglia sejtekre hatva módosítja azok gyulladássos és gyulladásgátló citokin termelését. Az inflammaszómák működésének gátlása is jelentős szerepet játszik az MSC-mikroglia kölcsönhatásban.

## Saját publikációk jegyzéke

### A disszertációhoz kapcsolódó közlemények:

**Beáta Hegyi**, Bernadett Sági, János Kovács, Judit Kiss, Veronika S. Urbán, Gabriella Mészáros, Éva Monostori, and Ferenc Uher: *Identical, Similar or Different? Learning about Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Various Mouse Tissues: Bone Marrow, Spleen, Thymus, and Aorta Wall*. *Int Immunol* 22:551-559. (2010) (IF=3,301)

Bernadett Sági, Pouneh Maraghechi, Veronika S. Urbán, **Beáta Hegyi**, Anna Szigeti, Roberta Fajka-Boja, Gyöngyi Kudlik, Katalin Német, Éva Monostori, Elen Gócza, Ferenc Uher: *Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs is Determined in the Post-Segmentation Mesoderm*. *Stem Cells and Development* 21:814-828. (2012) (IF=4,459)

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

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

**Beáta Hegyi**, Zsuzsanna Környei, Szilamér Ferenczi, Rebeka Fekete, Gyöngyi Kudlik, Éva Monostori, Krisztina Kovács, Emília Madarász, and Ferenc Uher: *Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells* (manuscript in preparation) (2013)

### A disszertációtól független közlemények:

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

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

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