

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM  
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR  
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA  
ÉS  
MTA SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT

**A mesenchymalis őssejtek funkcionális  
heterogenitása nem gyulladásos és gyulladásos  
mikrokörnyezetben**

*Ph.D. értekezés*

**Szabó Enikő**

Témavezetők:

Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.

Czibula Ágnes, Ph.D.

Szeged  
2015

<b>I. Rövidítések jegyzéke.....</b>	<b>4</b>
<b>II. Bevezető.....</b>	<b>6</b>
II.1. A mesenchymalis őssejtek (MSC) definiálása .....	6
II.2. Az MSC-k funkciói és jelentősége .....	7
II.3. Az MSC-k differenciálódása, szerepe a sérült szövetek újraképződésében.....	9
II.4. Az MSC-k szerepe az érékzödésben.....	10
II.5. Az MSC-k szerepe az immunválasz szabályozásában és a gyulladás csökkentésében .....	13
II.5.a. Az MSC-k immunmoduláló képességének fízológias eredete.....	13
II.5.b. Az MSC-k és a veleszületett immunitás .....	14
II.5.c. Az MSC-k és a szerzett immunitás.....	16
II.5.d. Az MSC-k immunszuppresszív faktorai.....	17
II.6. Az MSC-k funkcióit befolyásoló tényezök: mikrokörnyezet és heterogenitás .....	20
II.6.a. A gyulladásos mikrokörnyezet hatása az MSC-k funkcióira .....	20
II.6.a.1. Differenciáció és proangiogén hatás .....	20
II.6.a.2. Immunszuppresszív funkció .....	21
II.6.b. Az MSC funkciók inter- és intrapopulációs heterogenitása .....	23
<b>III. Célkitüzések.....</b>	<b>25</b>
<b>IV. Anyagok és módszerek.....</b>	<b>26</b>
IV.1. Az MSC kultúra izolálása, fenntartása és klónozása.....	26
IV.2. Sejtfelszíni markerek vizsgálata áramlási citometriával.....	26
IV.3. <i>In vitro</i> zsírsejt és csontképzö sejt irányú differenciáció.....	28
IV.4. Zsírsejt differenciáció vizsgálata AdipoRed™ reagenssel és citofluorimetriával ..	28
IV.5. A növekedés vizsgálata.....	29
IV.6. <i>In vitro</i> prevascularis struktúra teszt.....	29
IV.7. <i>In vitro</i> T-sejt proliferációs teszt.....	29
IV.8. T-sejt szeparáció és aktiválás .....	30
IV.9. Citokinmérés felülúszóból .....	31
IV.10. Western blot analízis.....	31
IV.11. Kvantitatív valós idejü (real-time) polimeráz lánreakció (qRT-PCR).....	32
IV.12. Késői típusú túlérzékenységi reakció kiváltása.....	33
IV.13. Statisztikai elemzés.....	34

<b>V. Eredmények.....</b>	<b>35</b>
V.1. Az MSC-k jellemzése .....	35
V.1.a. Sejtfelszíni markerek vizsgálata.....	35
V.1.b. Morfológia és növekedési tulajdonságok .....	37
V.1.c. <i>In vitro</i> csontképző és zsírsejt irányú differenciálódás.....	38
V.1. d. <i>In vitro</i> proangiogén hatás .....	40
V. 2. Immunszuppresszív aktivitás és immunszuppresszív faktorok; T-sejt osztódás gátlása <i>in vitro</i> .....	44
V.2.a. Az MSC-k <i>in vitro</i> T-sejt osztódást gátló hatása.....	44
V.2.b. Az immunszuppresszív faktorok génkifejeződése az MSC klónokban .....	47
V.2.c. Az <i>in vitro</i> T-sejt osztódás gátlásának hatásmechanizmusa .....	47
V.3. Gyulladásos faktorok hatása az MSC-k funkcióira .....	49
V.3.a. Differenciáció.....	49
V.3.b. Proangiogén hatás .....	51
V.3.c. T-sejt proliferáció gátlás <i>in vitro</i> modellrendszerben.....	52
V.4. <i>In vivo</i> DTH egérmodell alkalmazása az MSC-k és MSC klónok gyulladáscsökkentő hatásának igazolására .....	57
<b>VI. Következtetések .....</b>	<b>60</b>
VI.1. Az MSC-k differenciációja .....	60
VI.2. Az MSC-k proangiogén funkciója .....	61
VI.3. Az MSC-k immunszuppresszív funkciója .....	62
VI.3. Összefoglalás.....	65
<b>VII. Irodalomjegyzék.....</b>	<b>66</b>
<b>VIII. Saját közlemények .....</b>	<b>78</b>
<b>IX. Összefoglalás .....</b>	<b>80</b>
<b>X. Summary .....</b>	<b>83</b>
<b>XI. Köszönetnyilvánítás .....</b>	<b>86</b>

## I. Rövidítések jegyzéke

1-MT: 1-metil-triptofán

4T1: egér emlőkarcinóma sejtvonala

Angpt1: angiopoietin-1

Bglap: bone gla protein (csont Gla fehérje)

cAMP: ciklikus adenzin-3'-5'-monofoszfát

CD: cluster of differentiation (csoportdetermináns fehérjék)

cDNS: copy (másolati) DNS

CFSE: karboxifluorescein-diacetát-szukcimidilészter

ConA: concanavalin A

Ct: threshold cycle (áttörési ciklus)

CXCL: chemokine (C-X-C motívum) ligand (kemokin (C-X-C motívumot tartalmazó) ligand)

DMEM: Dulbecco's modified Eagle's medium (Dulbecco által módosított Eagle-féle médium)

DMSO: dimetil-szulfoxid

DNS: dezoxiribonukleinsav

DTH: delayed type hypersensitivity (késői típusú túlérzékenységi reakció)

EDTA: etilén-diamin-tetraecetsav

FBS: fetal bovine serum (magzati borjúsérum)

Gal-1: galektin-1

GAPDH: gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz

GFP: green fluorescent protein (zöld fluoreszcens fehérje)

GOI: vizsgálandó gén (gene of interest)

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

H5V: egér szív kapilláris endotél sejtvonala

HGF: hepatocyte growth factor (májsejt növekedési faktor)

HLA-G: humán leukocita antigén-G

HSC: hematopoietic stem cell (hematopoietikus őssejt)

HUVEC: human umbilical vein endothelial cell (humán köldökzsinór véna eredetű endotélsejt)

IDO: indolamin-2,3-dioxigenáz enzim

IFB: immunfluoreszcencia puffer

IFN- $\gamma$ : interferon-gamma

IGF-1: insulin-like growth factor-1 (inzulinszerű növekedési faktor-1)

IL: interleukin

L-NMMA: NG-metil-L-arginin-acetát

MHC: major histocompatibility complex (fő hisztokompatibilitási komplex)

mRNS: messenger ribonukleinsav (hírvivő ribonukleinsav)

MSC: mesenchymal stem cell (mesenchymalis őssejt)

NK-sejt: natural killer sejt (természetes ölősejt)

NO: nitrogén-monoxid

NOS: nitrogén-monoxid-szintáz enzim

PBS: phosphate buffered saline (foszfáttal pufferelt fiziológiás sóoldat)

PCR: polymerase chain reaction (polimeráz láncreakció)

PD-1: programmed cell death 1 (programozott sejthalál-1)

PD-L: programmed cell death ligand (programozott sejthalál ligand)

PDT: population doubling time (populáció kétszereződési idő)

PE: fikoeritrin

PGE2: prosztaglandin E2

PI: propídiium-jodid

PLP: proteolipid protein

PTGS2: prosztaglandin-endoperoxid szintáz 2

qRT-PCR: quantitative real-time polymerase chain reaction (kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció)

Runx2: Runt related factor 2 (Runt-szerű transzkripció faktor-2)

SD: standard deviance (standard deviáció)

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

SEM: standard error of the mean (az átlag standard hibája)

Spp1: secreted phosphoprotein 1 (szekretált foszfoprotein-1)

Stro-1: sztróma sejtantigén-1

Th: T helper cell (segítő T-sejt)

TNF- $\alpha$ : tumor necrosis factor alpha (tumor nekrozis faktor-alfa)

TGF- $\beta$ : transforming growth factor beta (transzformáló növekedési faktor-béta)

VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1 (vascularis sejtadhéziós molekula-1)

VEGF: vascular endothelial growth factor (ér-endotél növekedési faktor)

vWF: von Willebrand faktor

## II. Bevezető

### II.1. A mesenchymalis őssejtek (MSC) definiálása

A felnőtt csontvelőben elkülöníthetünk egy alaktanilag fibroblasztokra emlékeztető sztrómális sejtpopulációt. Ezek a sejtek *in vitro* kultúrában a tenyésztőedény aljához tapadnak (1), *in vivo* mezodermális eredetű szöveteket, mint csont-, porc-, zsír- és vérképzést segítő sztróma hoznak létre (2), és önmegújításra képesek. Ennek kísérletes bizonyítékául szolgál, hogy egyetlen sejtből létrejövő kolónia is immunhiányos egerek bőre alá ültetve apró, csonttal körülvett csontvelő „szervecskét” képez, melyet a recipiens szervezetének hematopoietikus őssejtjei (HSC) benépesítenek (3). A fent említett jellemzők tükrében ezeket a sejteket mesenchymalis őssejteknek (4) vagy sztrómasejteknek nevezzük.

Kolóniaképző, multipotens sejtek nem csak a csontvelőben fordulnak elő, hanem minden szövetünkben és szervünkben, mint például az agy, lép, máj, vese, tüdő, csecsemőmirigy, hasnyálmirigy, izom-, zsír-, porc- és ínszövet, ízületi belhártya, fogak gyökérhártyája, nagy erek, mint az aorta és végezetül perifériás vér, köldökzsínór vér és magzatvíz (5-13). Ezekben a tanulmányokban a szerzők nem egységes protokoll és kritériumrendszer alapján izolálták az MSC-szerű sejteket, mivel az MSC-knek saját, csak rájuk jellemző sejtfelszíni antigénjük nincsen. Az MSC-k felszínén meglévő markermolekulák fajoként (14,15), állattörzsenként (16) és szövetenként (13,17) is eltérő mintázatot mutatnak. A humán MSC meghatározására a Nemzetközi Sejtterápiás Társaság (ISCT: International Society for Cellular Therapy) a következő kritériumrendszert fogalmazta meg (18): az MSC

- kitapad a tenyésztőedény aljához (adherens)
- speciális sejtfelszíni antigénprofil jellemzi:
  - $\geq 95\%$  pozitív CD90, CD105 és CD73 molekulákra
  - $\leq 2\%$  pozitív CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 és MHC II vérsejtfejlődési sorokra jellemző molekulákra
- multipotens: *in vitro* differenciáltható csontképző, porc- és zsírsejt irányba.

Az egér MSC definiálásánál alkalmazhatjuk az adherenciát és multipotenciát, azonban az ISCT sejtfelszíni markerekre vonatkozó javaslatainál figyelembe kell vennünk, hogy az

egér MSC sejtfelszíni markerprofilja nem teljesen egyezik az emberével (1. táblázat). Például a CD90 kifejeződését egér MSC-n ellentmondások övezik (14,15).

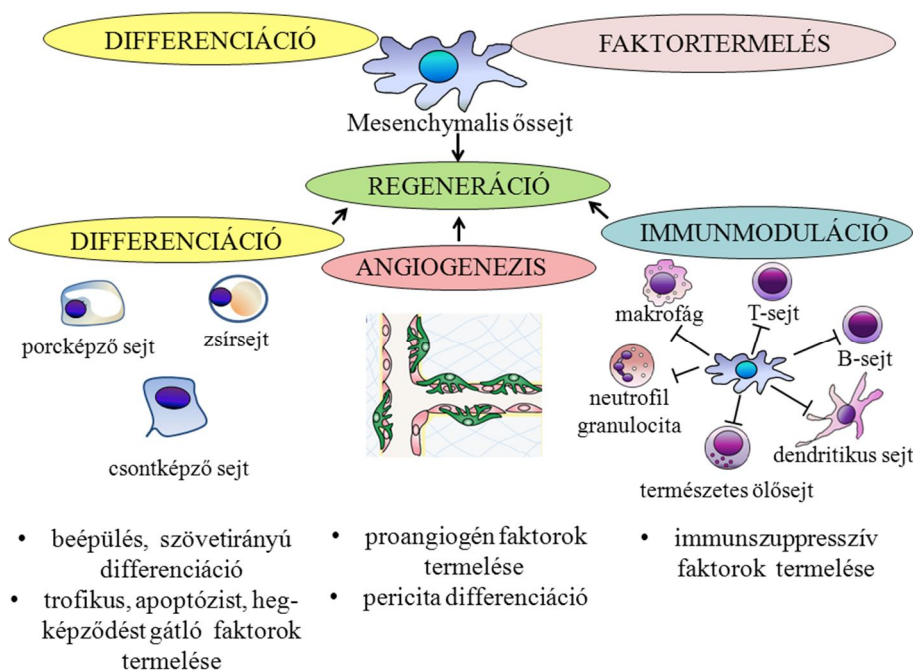
Sejtfelszíni antigén	Fehérje	Ember	Egér
CD13	alanin-aminopeptidáz	++	+/-
CD29	$\beta$ 1-integrinlánc	++	++
CD44	hialuronsav receptor	++	++
CD49e	$\alpha$ 5-integrinlánc	++	++
CD73	ekto-5'-nukleotidáz	++	+
CD90	Thy-1 antigén	++	+/-
CD105	endoglin	++	++
CD106	VCAM-1: vascular cell adhesion molecule 1 (vascularis sejtdhéziós molekula 1)	++*	++
CD146	MCAM: melanoma cell adhesion molecule (melanoma sejtdhéziós molekula)	++	++
CD166	ALCAM: activated leukocyte cell adhesion molecule (aktivált leukocita sejtdhéziós molekula)	++	+
CD271	LNGFR: low affinity nerve growth factor receptor (kis affinitású idegnövekedési faktor receptor)	++	n.a.
Sca-1	stem cell antigen 1 (őssejt antigén-1)	++	-
SSEA-4	stage-specific embrionic antigen-4 (stádium-specifikus embrionális antigén-4)	++	++
STRO-1	stromal precursor antigen 1 (sztrómális előalak antigén-1)	++	n.a.
MSCA-1	mesenchymal stem cell antigen 1 (mesenchymalis őssejt-antigén-1)	++	n.a.

**1. táblázat. Az ember és az egér MSC sejtfelszíni marker antigénjei.** A +/- jelek azt jelzik, hogy a populáció hány százaléka fejezi ki az adott antigént: ++ (50-100%), + (< 50%) és – (0%). További jelölések: +/- (ellentmondó adatok); n.a. (nincs adat); \* (TNF- $\alpha$  kezelés hatására fejeződik ki). A táblázat összeállításához a következő közleményeket használtuk fel: (15,19).

## II.2. Az MSC-k funkciói és jelentősége

Az MSC-k amellet, hogy számos sejtípussá képesek differenciálódni, számos biológiailag aktív faktort is termelnek (20), és ezen képességeik alapján a sérülést, szövetpusztulást követő regenerációban vehetnek részt. A regeneráció során szükség van az elhalt szövetek pótlására és az újonnan képződött szövetben új erek kialakulására, illetve a sérülést követő gyulladásos folyamatok csillapítására (1. ábra). Az MSC-k egyrészt segíthetik a sérült szövetek regenerációját azáltal, hogy a regenerálandó szövet

irányába differenciálódnak, vagy apoptózis- és hegképződésgátló anyagokat szabadítanak fel, valamint trofikus faktorokkal stimulálják a nyugvó szöveti progenitor sejtek osztódását (21). Másrészt a sérülés helyén támogatják az új erek képződését proangiogén faktorok termelésével (22), és pericitaként funkcionálva támaszthatják az újonnan képződő ereket (23). Harmadrészt a szövetpusztulás során fellépő gyulladást és immunválaszt gátolhatják (24). Az MSC-k különböző folyamatokban betöltött szerepét külön taglaljuk differenciálódási és faktortermelési szempontból.



**1. ábra. Az MSC-k kettős tulajdonságának megnyilvánulása a szöveti regeneráció folyamatában.**

A fent említett funkcióikat kiaknázva az MSC-k a hematopoietikus őssejtekhez hasonlóan sejterápiás eszközként alkalmazhatóak, felhasználási módjuk azonban rendkívül sokféle lehet a sejtek közvetlen vénába oltásától, az ásványhordozóra kitapasztott sejtek transzplantációján át az MSC-k által termelt faktorok, mikrovezikulák bejuttatásáig. A klinikumban való megjelenést a betegségmodellekben kapott biztató eredmények alapozták meg. Az MSC-k klinikai kipróbálása 1995-ben kezdődött (25) és napjainkban nagyon intenzíven zajlik. Az egyesült államokbeli Nemzeti Egészségügyi Intézet (National Institutes of Health, NIH) által létrehozott ClinicalTrials.gov honlap



adatbázisába eddig több mint 650 olyan tesztet regisztráltak (2015. október), amelyben mesenchymalis őssejteket vagy sztrómasejteket használtak terápiás célból. A honlap adatai szerint már 39 országban folynak klinikai vizsgálatok MSC-vel, és a klinikai tesztek fele 2-es klinikai fázisba lépett (26). Az MSC terápiával kezelni kívánt betegségek köre rendkívül szerteágazó, és vannak olyan területek, melyeknél több biztató eredmény is összegyűlt: reumás ízületi gyulladás, artrózis (27,28), szisztémás lupus erythematosus (29-31), miokardiális infarktus (32-36), Crohn-, és graft-versus-host betegség (GVHD) (37,38). Mivel az MSC-k a szervezetben a meglévő tumorokba vándorolnak, ez a tulajdonságuk felvetette annak a lehetőségét, hogy a sejtölő faktorok termelésére genetikailag módosított MSC-k a daganatban hatékonyan pusztítsák a rákos sejteket. Citokinek, elődrogokat átalakító enzimek, érképződést gátló és apoptózist elősegítő anyagok termelésére módosított MSC-k hatékonyan bizonyultak különböző *in vivo* tumormodellekben. Ugyanakkor a genetikailag módosított MSC-k használata nem ismert kockázatot jelenthet, épp ezért daganatterápiára nem használnak módosított MSC-eket (39).

### **II.3. Az MSC-k differenciálódása, szerepe a sérült szövetek újraképződésében**

Mint már említettük, az MSC-k a szövetek újraképződése során közvetlenül beépülhetnek az adott szövetbe különféle sejtekké történő differenciáció után. Az MSC-k *in vitro* differenciálhatóak mezodermális (csont-, porc-, zsír-, ín- és izomszövet) irányokba (40,41). A későbbiekben a felsorolt irányokba az MSC *in vivo* differenciációja is igazolást nyert, több kísérletes állatmodellben és humán regeneratív terápiában sikerült bizonyítani az MSC-k differenciáció utáni közvetlen beépülését a sérült szövetbe. A humán csontvelőből izolált, kitapadó MSC-k egér szívizomba oltva beépültek, szívizommá differenciálódtak, ezekre a sejtekre jellemző fehérjéket (dezmin,  $\beta$ -miozin nehéz lánc,  $\alpha$ -aktinin, troponin T) fejeztek ki, és a sejtekben szarkomer struktúrák is felfedezhetőek voltak (42). Kecské csontvelői, kitapadó, multipotens, zöld fluoreszcens fehérjével (GFP) jelölt MSC-k kecskék térdizületében sebészi úton kialakított artrózis modellben szignifikánsan serkentették a sérülés regenerációját, és GFP-jel alapján kimutathatóak voltak az újonnan képződő porcszövetben (43). Patkány csontvelői, fluoreszcensen jelölt, CD31<sup>-</sup>, CD34<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD90<sup>+</sup> MSC-k kísérletes patkány szívizomelhalás modellben szívizomba oltva szívizomsejtekké differenciálódtak, és az új erek képződésében is részt vettek dezmin, troponin T, illetve von Willebrand faktor (vWF) festődés alapján (44). Egér csonttörés modellben egér csontvelői CD11b<sup>-</sup>, CD45<sup>-</sup>, CD73<sup>+</sup>,

CD44<sup>+</sup>, CD29<sup>+</sup> MSC-k az eltört csontvégeknél képződő új csontszövetben, a kalluszban csontképző sejtekké és csontsejtekké differenciálódtak (45).

Az MSC-k terápiás hatékonyságát több kísérletes modellben és klinikai tesztben igazolták, de a legtöbb esetben nem volt kimutatható az MSC-k beépülése a regenerálódó szövetbe, amiből az következik, hogy az MSC-k a szöveti differenciációt serkenthetik egy másik mechanizmus által is, mégpedig az apoptózist gátló és a nyugvó szöveti őssejtek osztódását stimuláló növekedési faktorok termelésével (46). A már említett patkány szívizomelhalás modellben az MSC-k *in vitro* szövettenyészetben proangiogén ér-endotél növekedési faktort (vascular endothelial growth factor, VEGF), apoptózist gátló adrenomedullint, mitogén és proangiogén májsejt (hepatocita) növekedési faktort (HGF) és mitogén inzulinszerű növekedési faktor-1-et (IGF-1) termeltek, melyek szintje az MSC-vel kezelt állatok vérében megnőtt, ellenben azt nem bizonyították, hogy ezeket a faktorokat valóban az MSC-k termelték *in vivo* (44). A már szintén korábban említett csonttörés modellben a kallusz endostealis részén csontképző sejtekké differenciálódott MSC a törött csont összeforrásában alapvető szereppel bíró csont morfogenetikus fehérje-2-t (bone morphogenetic protein 2, BMP-2) szekretált, amely irányítja a csontképző sejtek differenciációját a sérülés helyén (45,47). Természetesen léteznek olyan vizsgálatok is, ahol az MSC-k differenciációja a regenerációban kizárható volt a kísérleti elrendezés miatt. Példának okáért, ha az MSC-k kondicionált médiumát használjuk fel terápiás eszközként, akkor az MSC-k által termelt parakrin faktorok vagy mikrovezikulák vizsgálatára nyílik lehetőség. Az MSC szekréta számos citokin, növekedési faktor, extracelluláris mátrixfehérje és szövetmegújulásban részt vevő enzim egyvelege (48), míg az 50-1000 nm-es mikrovezikulák fehérjék mellett mRNS, mikroRNS és lipidmolekulákat is tartalmaznak (49). Az MSC-k kondicionált médiuma és az abból kinyert mikrovezikulák gyógyászatilag hatékonyak bizonyultak több kísérletes állatmodellben is mint például szívinfarktus, máj-, vese-, tüdő-, és agykárosodás (50-55).

#### **II.4. Az MSC-k szerepe az érképződésben**

Vannak olyan esetek, amikor a szöveti regenerációhoz fokozottan szükség van új erek képződésére is pl. szélütést vagy infarktust követően, illetve krónikus sebek, szervkárosodások, vagy csonttörések gyógyulásánál, esetleg szövettranszplantáció után. Több kísérleti adat is alátámasztja, hogy az MSC-k serkentik az érképződést, mely

folyamatban mind az eret alkotó sejtek irányába történő differenciáció, mind a proangiogén faktorok termelése szereppel bír (56).

Az MSC-k endotélsejt irányba történő differenciációját ellentmondások övezik, ugyanis az MSC-k az *in vitro* differenciáció során kifejezik az endotélsejtekre jellemző molekulákat (CD31, CD34, VEGF receptor 1 és 2, vascularis sejtadhéziós molekula-1 (VCAM-1), vWF) (57,58), ez azonban még nem elegendő, hogy ezeket a differenciálódott MSC-eket endotélsejteknek nevezhessük. Az endotélsejt differenciációt funkcionális tesztekkel is igazolni kell. Az egyik lehetőség erre az érszerű ún. prevascularis struktúra teszt, melyben az MSC-k VEGF jelenlétében speciális mátrixon prevascularis struktúrákat képeznek (57,58). Ez a speciális mátrix a Matrigél, amely az Engelbreth-Holm-Swarm egér szarkóma sejtek által termelt, alapmembránhoz hasonló összetételű extracelluláris mátrix. VEGF hatására nem minden esetben fejeződtek ki az említett endotélsejt markerek (59). Ezen túlmenően csak egyetlen tanulmány van, melyben elektronmikroszkópos felvételekkel támasztották alá, hogy a differenciált MSC-k endotélsejtekre jellemző morfológiával, Weibel-Palade testekkel, szoros kapcsolatokkal és caveolakkal rendelkeznek (60). Emellett kevés adatot találhatunk a szakirodalomban, mely az MSC-k *in vivo* endotélsejt differenciációját megerősíti. Az egyik ilyen adat az előző fejezetben már említett kísérletes patkány szívizomelhalás modellből származik, amikor szívizomba adva az MSC-eket, azok szívizomsejteken kívül endotélsejteké is differenciálódtak vWF festődésük alapján (44). Az MSC-k endotélsejt irányú differenciációjával szemben az elmúlt években sokkal inkább teret hódított az a nézet, hogy az MSC-k a csontvelőben, más szervekben és szövetekben is erek közelében helyezkednek el és gyakorlatilag pericitaként funkcionálnak (21). Ennek az elméletnek az alapját az a munka képezte, melyben humán vázizomból, méhlepényből, hasnyálmirigyből és zsírszövetből pericitákat izoláltak, melyek pozitívak voltak MSC markerekre (CD44, CD90, CD73 és CD105), negatívak endotélsejt, hematopoietikus sejt és vázizom markerekre (CD34, CD45, CD56), és differenciálhatóak voltak zsír, csont, porc és izom irányba (61). Az erek közelében elhelyezkedő MSC-eket CD146 kifejeződésük alapján lehetett megkülönböztetni a többi MSC-től. A CD146<sup>+</sup> MSC-k a csontvelői MSC-knek az az alpopulációja, mely képes volt megújítani önmagát és létrehozni azt a niche-t, melyből származott vagyis hidroxipatit kristállyal együtt bőr alá beültetve parányi csontvelőszervet alakított ki, melyben HSC-k jelentek meg (3). Egy friss közlemény szerint a CD146<sup>-</sup> csontvelői multipotens sztrómasejtek *in vitro* angiogenezis modellben kevésbé hatékonyak, mint az erek

közelében elhelyezkedő CD146<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> MSC-k (62). A fenti adatok arra utalnak, hogy a különböző szövetekben lévő periciták is MSC-k, de nem minden MSC helyezkedik el erek közelében, és az eltérő lokalizáció funkcionálisan eltérő jellegeket von maga után. MSC-k forrásul nem csak periciták, de a nagy artériák külső rétege is szolgálhat (63). Másrészt pedig az *in vitro* angiogenesis modellben az MSC mint támasztósejt, pericita vesz részt (23). Ebben az *in vitro* modellben a humán MSC-k és a humán köldökzsinór véna eredetű endotélsejtek (human umbilical cord vein endothelial cell, HUVEC) az együttenyésztés során Matrigél vagy más extracelluláris mátrix komponens nélkül is epidermális növekedési faktor jelenlétében prevascularis struktúrákat képeztek. A HUVEC-ek által *in vivo* alkotott ereket az MSC pericitaként körülvette és élettartamukat meghosszabította (64).

Az érképződés serkentésének másik aspektusa az, hogy az MSC-k proangiogén és mitogén faktorokat termelnek. Az MSC-k VEGF-et, HGF-et, IGF-1-et, transzformáló növekedési faktor- $\beta$ -t (TGF- $\beta$ ), fibroblaszt növekedési faktor-2-t (FGF-2), angiopoietin-1-et, monocita kemoattraktáns protein-1-et, interleukin(IL)-6-ot, placenta-eredetű növekedési faktort és még számos más proangiogén funkciójú faktort szekretálnak (22,50,65-67). Ezeknek a faktoroknak a hatása az endotélsejtek angiogenesisének egyes lépéseire (endotélsejtek osztódása, vándorlása, extracelluláris mátrix bontása, prevascularis struktúra képzése) *in vitro* rendszerekben jól tetten érhető. A proangiogén faktorok termelése által az MSC-k, vagy az MSC sejtkultúra kondicionált médiuma fokozta az endotélsejtek osztódását és vándorlását egy speciális tenyésztőedény felső kamrájából az alsó kamrájába szérum mentes környezetben, illetve csökkentette az endotélsejtek apoptózisát (50,68,69). Sőt, az MSC-k kondicionált médiuma serkentette az endotélsejtek extracelluláris mátrix bontását is (69). Ezen túlmenően önmagában az MSC-k kondicionált médiuma is kiváltotta az endotélsejtek prevascularis struktúrákba rendeződését Matrigélen vagy fibringélen (65,70). Saját kísérleteink alapján tudjuk, hogy az MSC-k által termelt galektin-1 (Gal-1) fontos szereppel bír az MSC-k érképződést elősegítő szerepében mind *in vitro*, mind *in vivo*, ugyanis galektin-1 hiányos egérből származó MSC-k endotélsejtekkel kevesebb prevascularis struktúrát képeztek, és a 4T1 emlőtumor mikroerzetségét is a vad típusú MSC-khez képest kevésbé növelték (71).

## **II.5. Az MSC-k szerepe az immunválasz szabályozásában és a gyulladás csökkentésében**

### II.5.a. Az MSC-k immunmoduláló képességének fiziológias eredete

Az ezredforduló felfedezései közé tartozik, hogy az MSC-k gátolják az immunválaszt (72), mely a kutatók figyelmét az MSC-k immunrendszerrel való kapcsolatára irányította. A csontvelői MSC-k immunmoduláló képességét abból eredeztetik, hogy az MSC-k elsődleges szerepe a csontvelőben a hematopoietikus niche fenntartása és védelme a gyulladásos folyamatoktól. Kísérleti adatok arra utalnak, hogy a hematopoietikus niche kialakítása nem minden csontvelői MSC alpopuláció sajátja, csak a CD146<sup>+</sup>, vagy nestin<sup>+</sup> MSC-kre jellemző. Ezt bizonyítja, hogy a CD146<sup>+</sup> MSC-k bőr alá oltva kis csontvelő szervet, hematopoietikus niche-t alakítanak ki, melybe hematopoietikus sejtek telepednek meg (3). Más megfigyelések szerint az intermedier filamentum nestint kifejező MSC-k számos, a hematopoiesis fenntartásához szükséges faktort termelnek, például az angiopoietin-1-et, osteopontint, IL-7-et, VCAM-1-et és kemokin (C-X-C) motívumot tartalmazó ligand-12-t (CXCL-12). A nestin<sup>+</sup> MSC-k vérképzés támogatásában betöltött szerepét *in vivo* is igazoták, mivel a nestint kifejező sejtek szelektív elpusztítását a HSC-k számának csökkenése követte, illetve a letálisan besugárzott egereknél a HSC-k a csontvelő benépesítésekor a nestin<sup>+</sup> MSC-k közelében telepedtek meg (73). Egyéb szövetekben előforduló MSC-k immunmoduláló képességének eredetére két elképzelés áll fenn. Az egyik szerint a szöveti sérülés esetén kisebb erek is károsodhatnak, miáltal a periciták nyugalmi állapota megbomlik, aktiválódnak és trofikus, illetve immunmoduláló sejtekké válnak, amelyek azonosak a szöveti MSC-kkel (20). A másik elmélet szerint az immunszabályozásban a különböző szövetek sztrómájának van szerepe, ugyanis nem csak a szöveti MSC-k, de más sztrómális sejtek, mint pl. különböző szövetekből származó fibroblasztok is immunszuppresszívek (74). Példának okáért az artrózisban vagy reumás ízületi gyulladásban szenvedő betegek ízületi belhártyájából izolált fibroblasztok is gátolták a T-sejtek proliferációját és citokintermelését (75). Ezzel szemben a megváltozott működésű ízületi belhártya fibroblasztjai aktív módon közreműködnek a reumás ízületi gyulladás fenntartásában és feltehetőleg kialakulásában is (76).

## II.5.b. Az MSC-k és a veleszületett immunitás

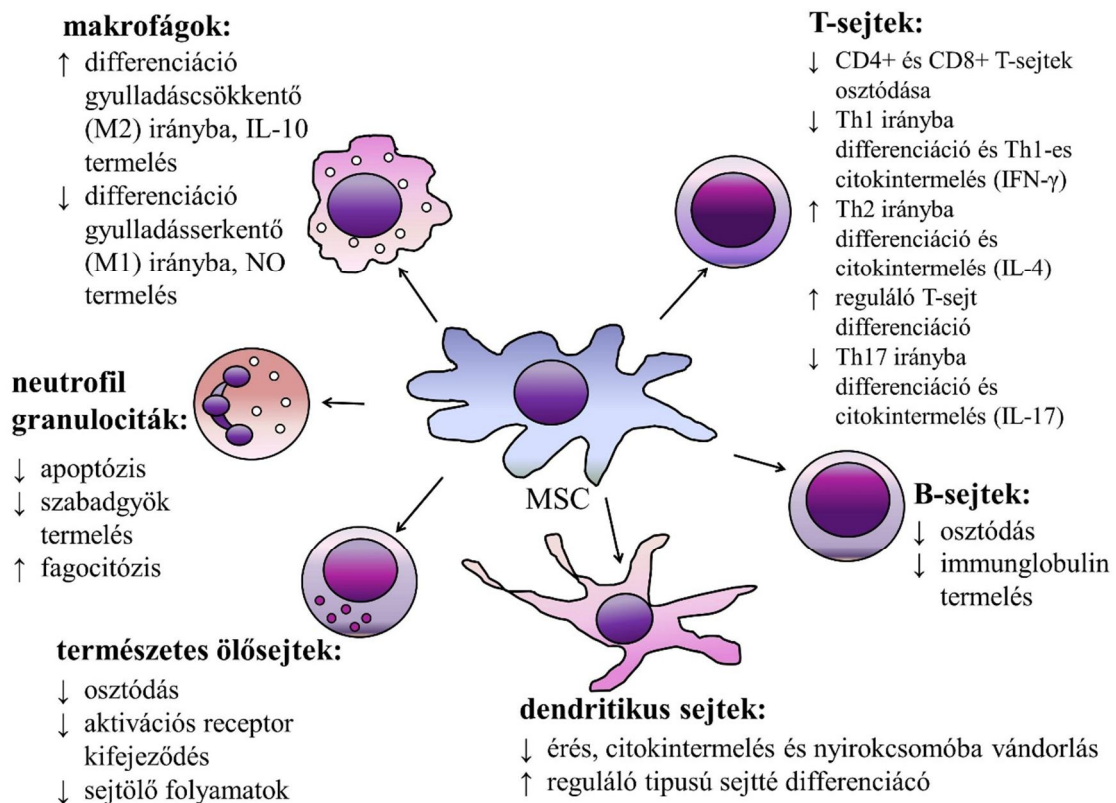
Az MSC-k a veleszületett immunitásban résztvevő sejtípusok működését befolyásolják, így az immunválasz során a kórokozók elleni első védelmi vonalat is szabályozzák.

A makrofágoknak kétféle altípusa alakulhat ki a kórokozók molekuláris mintázata és különböző immunsejtek által kibocsátott mediátorok hatására. Az M1-es gyulladásgátló makrofágok nagy mennyiségű gyulladásgátló citokint (tumor nekrozis faktor-alfa (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$ , IL-12), különböző kemokineket és sejtpusztító hatású reaktív oxigén- és nitrogéngyököket (pl. NO) termelnek, ezáltal képesek a kórokozókat elpusztítani és a gyulladást, illetve a Th1-függő immunválaszt fokozni. Az M2-es makrofágok ezzel szemben gyulladásgátló hatásúak, immunszuppresszívok, és szerepük van a szövetek regenerációjában (77). Az MSC-k képesek a makrofágok polarizációját M2-es irányba eltolni, amit a gyulladásgátló hatású IL-10 emelkedett szintű termelése és a gyulladásgátló citokinek csökkentett felszabadítása jellemez (78). Az MSC-k immunszuppresszív hatását több *in vivo* szövetregenerációs állatmodellben is összefüggésbe hozták a makrofágok M2 irányba történő polarizációjával. Például az MSC-k segítették a kísérletesen előidézett infarktuson átesett patkányok szívizomjának regenerációját, melyben a szívizomba adott MSC-k maguk köré toborozták az M2-es makrofágokat (79). Az MSC-k makrofágokkal *in vitro* együtt-tenyésztve polarizálták a makrofágokat M2-es altípus irányába, mely emelkedett M2-es, csökkent M1-es altípusra jellemző citokintermelésben és enzimaktivitásban tükröződött. Feltehetőleg a szívizomba juttatott MSC-k is hasonló módon befolyásolják a magukhoz toborzott M2-es makrofágok citokin- és enzimaktivitását, erre vonatkozóan azonban az *in vivo* modellben a szerzők közvetlen bizonyítékkal nem szolgáltak (79).

A neutrofil granulociták is a természetes immunitás fontos elemei. A neutrofil granulociták által bekebelezett baktériumok elpusztításának egyik elfogadott mechanizmusa a szabadgyöktermelés, ugyanakkor a szabadgyöktermelés nem megfelelő szabályozása kóros állapotokat, súlyos szövetkárosodást is előidézhet a szervezetben (80). Az MSC-vel előinkubált neutrofil granulociták kevesebb szabadgyököt termelnek, de a kísérletes (opszonizált zimosán) fagocitáló képességük nem változik (81). Mi több, egy tanulmány arról számolt be, hogy az MSC-k segítik a neutrofilok baktérium bekebelezését (82). Emellett az MSC-k csökkentik a neutrofil granulociták apoptózisát kokultúra rendszerben (81).

A természetes ölüsejtek (natural killer, NK) szerepe a fertőzött és daganatsejtek elpusztítása és gyulladásos citokinek termelése. Az MSC-k gátolják az NK-sejtek osztódását, aktivációs receptor kifejeződését és sejtölő aktivitását különböző tumorsejtvonalakkal szemben (83,84), ellenben az MSC-k hatása az NK-sejtek gyulladásos citokintermelésére nem egyértelmű (85).

A dendritikus sejtek legfontosabb feladata a feldolgozott antigének bemutatása a T-sejteknek, mely folyamat hidat képez a veleszületett és a szerzett immunitás között. Az MSC-k gátolják a dendritikus sejtek *in vivo* érését, citokintermelését és nyirokcsomókba történő vándorlását (86). Májkárosodás *in vivo* modelljében az MSC kezelés előidéz a dendritikus sejtelőalakok reguláló típusú történő differenciációját, mely sejtek segíthetik a reguláló T-sejtek differenciációját (87).



2. ábra. Az MSC-k hatása az immunsejtekre

### II.5.c. Az MSC-k és a szerzett immunitás

A szerzett immunitás részeként a B- és T-sejtek klónjai receptoraikkal a patogének specifikus molekuláit (antigénjeit) ismerik fel lehetővé téve az adott kórokozó elleni hatékony védelmet (2. ábra). A T-sejtek miután receptorukkal felismerték az antigént, osztódásba kezdenek és különböző effektor funkciókat látnak el (citokintermelés, sejtölés). A B-sejtek az antigéneket felismerő ellenanyagok termelésére specializálódtak. A következőkben bemutatjuk, hogy az MSC-k hogyan befolyásolják ezeknek a sejteknek a működését.

Az MSC-k szövettanyészetben gátolják a B-sejtek osztódását megrekesztvén a sejtciklusukat G0/G1 fázisban, és csökkentik a B-sejtek immunglobulin termelését is (88). Az MSC-k gátló hatása különböző kórképekre jellemző antitestek termelésére is tetten érhető. A szisztémás lupus erythematosus *in vivo* egér modelljében a ciklofoszfamiddal kombinált humán MSC adása jelentősen mérsékli a betegségre jellemző kettős-szálú DNS molekulák elleni antitestek mennyiségét az állatok szérumában (89). A sclerosis multiplex egér modelljében az autoantigénként használt proteolipid protein (PLP) fehérjével reagáló autoantitestek mennyiségét az MSC kezelés csökkenti (90).

Az MSC-k a humorális válasz effektor sejtjein kívül gátolják a gyulladásos T-sejtek (Th1, Th17) funkcióit is (91). Ilyen vonatkozásban az első megfigyelések egyike az volt, hogy az allogén vagy az autológ humán MSC-k egyaránt gátolják a PHA-stimulált CD4<sup>+</sup> és a CD8<sup>+</sup> T-sejtek osztódását (92). Az MSC-k a CD4<sup>+</sup> T-sejtek citokinszekréciónak Th2 irányba tolják el, ugyanis a humán MSC-k csökkentik a Th1 irányba differenciáltatott T-sejtek IFN- $\gamma$  termelését, és fokozzák a Th2 irányba differenciáltatott T-sejtek IL-4 szekréciónak. Megfigyelték azt is, hogy az MSC-k és az IL-2-vel kezelt perifériális vér mononukleáris sejtjeinek (peripheral blood mononuclear cells, PBMC) kokultúrájában magasabb a CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> reguláló T-sejtek száma az MSC nélküli PBMC kultúrához képest (93). Az MSC-k *in vitro* kokultúrában T-sejtekkel csökkentik a Th17-sejt differenciációnak kedvező citokinek mennyiségét, a Th17-sejtek arányát és IL-17 termelését (94). Az MSC-k különböző *in vivo* állatkísérletes betegségmodellekben is gátolják a T-sejtek által kifejtett patológiás, gyulladásos folyamatokat. Egerekben streptozotocinnal kiváltott 1-es típusú cukorbetegségben az inzulintermelő  $\beta$ -sejtek elleni T-sejtes immunválaszt a csontvelői MSC-k visszaszorították, így segítették a hasnyálmirigy regenerációnak (95).

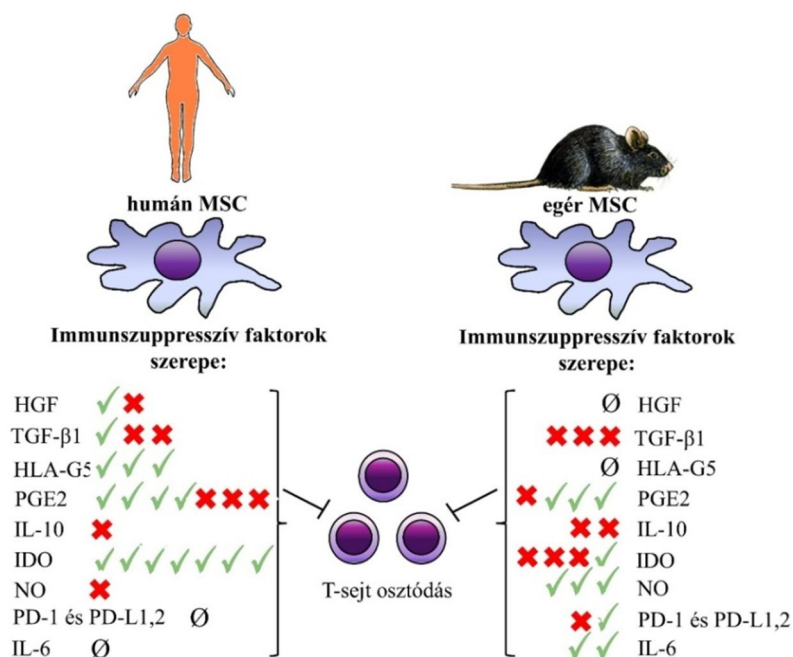


## II.5.d. Az MSC-k immunszuppresszív faktorai

Az MSC-k immunszuppresszív hatásának mechanizmusát sok tanulmány igyekezett feltárni, melyek rámutattak, hogy az MSC-k immunregulációja egy összetett, többfaktoros, fajspecifikus folyamat. A következő fejezet a humán és egér MSC-k legfontosabb immunszuppresszív faktorairól fog áttekintést adni (3. ábra). Mivel a vizsgálatok többsége az MSC-k T-sejtekre gyakorolt hatására irányult, így ebben a fejezetben az ebben a folyamatban részt vevő faktorokról lesz szó a felfedezés időrendi sorrendjében.

A humán MSC-k számos, az immunválasz szabályozásában szereppel bíró mediátort termelnek. A TGF- $\beta$ 1 az immuntolerancia kialakításában vesz részt a T- és B-limfociták proliferációjának, differenciációjának és túlélésének szabályozásával (96). A HGF-et kezdetben mint májsejtekre és különböző epitelsejtekre mitogén hatású fehérjét tartották számon. Immunreguláló szerepére először az a GVHD modellel végzett tanulmány világított rá, melyben igazolták, hogy azon egerek bélepitéliuma, melyek vázizmába HGF-et transzfektáltak, kevésbé károsodott, és párhuzamosan a T-sejtek májba történő infiltrációja csökkent (97). A humán MSC-k által termelt TGF- $\beta$ 1 és HGF szerepe ellentmondásos, ugyanis ezeket a fehérjéket neutralizáló ellenanyagok enyhítették az MSC-k gátló hatását a kevert limfocita reakcióra (92), míg más csoportok által végzett vizsgálatokban a neutralizáló ellenanyagok nem befolyásolták az MSC-k osztódásgátló hatását aktivált T-sejtekre (98,99). A nem klasszikus MHC I molekulák közé tartozó humán leukocita antigén-G (HLA-G) immunszuppresszióban betöltött szerepe a magzattal szembeni anyai tolerancia kialakításánál vált nyilvánvalóvá. Egyik szolubilis izoformája, a HLA-G5 kevert limfocita reakcióhoz adva részlegesen gátolja a T-sejtek osztódását (100). A HLA-G5 funkcióját az MSC-k T-sejt osztódásgátlásában több tanulmány is egyértelműen bizonyította neutralizáló ellenanyagok segítségével (101-103). A prosztaglandin E2 (PGE2) szerepe azért merült fel, mert a T-sejtekben az EP2/EP4 receptorokon keresztül, cAMP-mediált úton a különböző jelátviteli folyamatok végül a T-sejtek osztódásának gátlását eredményezik (104). Az eddigi adatok ellentmondásosak: egyes tanulmányok arról számolnak be, hogy az MSC-kben a PGE2 szintézisének gátlása részlegesen vagy teljesen visszafordítja az MSC-k T-sejt osztódást gátló hatását (93,99,105,106), míg mások szerint a PGE2 szintézis gátlása nem befolyásolja az MSC-k ilyen funkcióját (74,105,107). Nemcsak a humán MSC-k, hanem számos sejtfeleség termel IL-10-et, egy olyan citokint, melynek meghatározó szerepet tulajdonítanak a gyulladásos

és autoimmun kórképek kialakulásának megelőzésében (108). Az MSC-eredetű IL-10 mégsem járul hozzá az MSC-k T-sejtekre kifejtett osztódásgátló hatásához (105). A humán MSC-k legfontosabb immunmoduláló faktora az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), egy triptofán lebomlást katalizáló enzim, ami melléktermékként kinurenint és más anyagcseretermékeket eredményez. IDO-t többféle sejt is termel, pl. makrofágok, dendritikus sejtek és fibroblasztok (74,109). Az IDO triptofánszegény környezetet teremtve vagy a kinurenin út anyagcseretermékeinek proapoptotikus hatásán keresztül gátolja a T-sejtek osztódását (109). A humán MSC-k által termelt IDO szerepét azok triptofán analóggal történő kezelésével több tanulmány is igazolja, mivel az IDO enzimműködésének gátlása az MSC-k T-sejt osztódásának gátlását megszünteti (74,99,106,107,110-112). A triptofán pótlása MSC-T-sejt kokultúrában megszünteti az MSC gátló hatását a T-sejtek osztódására, mely azt támasztja alá, hogy az IDO a triptofán megvonásán keresztül hat (110), míg más kísérletben a kinurenin is szignifikánsan csökkenti a T-sejtek osztódását (106).



**3. ábra. A humán és az egér MSC-k immunmoduláló faktorai.** A zöld pipajelek és piros X-ek az adott immunszuppresszív faktor szerepét megerősítő vagy cáfoló közlemények számát jelzik. A ∅ azt jelzi, hogy nem találtunk erre a faktorra vonatkozó adatot T-sejt osztódás gátlást illetően.

A rágcső MSC-k immunszuppresszív faktorai részben egyezők a humán MSC-ével, ugyanakkor lényeges különbségeket is találhatunk. Az egér MSC-k konstitutívan

kifejezik a TGF- $\beta$ 1-et, és a TGF- $\beta$ 1 gátolja a T-sejt osztódást (91), ugyanakkor a TGF- $\beta$ 1 semlegesítése specifikus ellenanyaggal nem okoz változást az MSC immunszuppressziójában, ami a TGF- $\beta$ 1 szerepét cáfolja (113-115). Két másik faktor, a HGF és IL-10 nem gátolja az egér T-sejtek osztódását (91), amit megerősítenek az MSC-T-sejt kokultúrában IL-10-et semlegesítő ellenanyaggal kapott eredmények (113,115). Az egér MSC-k is konstitutívan szintetizálják a PGE2-t (91), de annak fontossága az immunszuppresszióban még vitatott. Specifikus gátlószerekkel több független csoport is igazolta a PGE2 részleges szerepét az MSC-k által T-sejtekre kifejtett osztódásgátlásban (91,114,116), míg mások kísérleteiben a PGE2 szintézis gátlása nem állította helyre a T-sejtek osztódását (115). A T-limfociták B7 kostimulációs molekulákkal homológiát mutató receptor membránfehérjéje, a programmed cell death 1 (programozott sejthalál-1, PD-1) és az antigént prezentáló sejtek felszínén lévő ligandmolekulái (PD-L-ek) között kialakuló kölcsönhatásaként a T-sejt receptoron és kostimulációs molekulákon keresztüli T-sejt aktiváció gátlást szenved (117). A limfocitákkal együtt tartott MSC-k felszínén a PD-1 ligandmolekuláinak (PD-L1 és PD-L2) kifejeződése indukálódik. A limfociták PD-1 molekulája és az MSC-k sejt felszínén lévő PD-L1 és PD-L2 kölcsönhatásaként mind a T-sejtek, mind a B-sejtek osztódása csökken, ugyanis az ezeket a molekulákat semlegesítő ellenanyagok részben megszüntetik az MSC gátló hatását a T-sejtekre és B-sejtekre (118). A PD-1 siRNS-sel történő csendesítése szignifikánsan csökkenti az MSC-k *in vitro* immunszuppresszióját (119), míg English és kollégái szerint a PD-1 és ligandjainak blokkolása nem állítja helyre az MSC-k által gátolt T-sejt osztódást (91). Az IL-6-hoz mind gyulladás-serkentő, mind gyulladásgátló funkciók kapcsolhatók (120). Az egér MSC-k által termelt IL-6 immunszuppresszív szerepét két közlemény hangsúlyozza. Az IL-6-ot semlegesítő ellenanyag részben feloldja az MSC-k gátló hatását (116), és az IL-6-deficiens MSC a vad típusú MSC-hez képest kevésbé gátolja a T-sejtek proliferációját (121). Az IDO részleges szerepét egér MSC T-sejtekre gyakorolt osztódásgátló hatásában eddig csak egyetlen közleményben mutatták ki (91), más kutatóknak ezt nem sikerült megismételni (99,114,115). A rágszáló MSC-k fő immunszuppresszív faktora a nitrogén-monoxid (NO). A NO magas koncentrációban különböző hatásmechanizmusok révén gátolja a mitokondriális légzést, a fehérjeszintézist és DNS-, sejt-, illetve szövetkárosodást okoz (122). A NO-ot a különböző NO szintázok (endothelialis; neuronális és indukálható NOS) állítják elő (114). Rágszálókból a makrofágok az L-arginin L-citrullinná átalakítása során nagy mennyiségű NO-t termelnek (123). MSC-kben az indukálható NOS (iNOS vagy

NOS2) gyulladáscitokin stimulusra termeli a NO-t, mely gátolja a T-sejtek osztódását (114,115). Az MSC-k által termelt NO *in vivo* funkcióját igazolja, hogy egér GVHD és ízületi gyulladás modellben az iNOS-hiányos egérből származó MSC-k csekélyebb terápiás hatékonyságúak, mint a vad típusú egérből izolált MSC-k (115,121). Rendkívül izgalmas, hogy az emberből, kecskéből és nyúlból származó makrofágok nem rendelkeznek iNOS aktivitással (124). A humán-, sertés- és majomeredetű MSC-kben sem figyelhető meg iNOS aktivitás, és specifikus gátlószerekkel nem igazolható a NO szerepe a T-sejt osztódás gátlásában, míg rágszál MSC-kben magasabb az iNOS aktivitás és az iNOS gátlásával az MSC-k osztódásgátló képessége jelentősen csökken (112,125).

Összegzésként megállapíthatjuk, hogy mind a humán, mind a rágszáló MSC immunosuppressziójában a PGE2 részleges szereppel bír, azIDO a humán, a NO pedig a rágszáló MSC-k meghatározó immunmoduláló faktora. A humán MSC immunosuppressziójában a HLA-G szerepét is több tanulmány megerősíti. A többi faktor esetében az eredmények meglehetősen ellentmondásosak, vagy a szerepüket illetően mindeddig csak kevés vizsgálat történt (3. ábra).

## **II.6. Az MSC-k funkcióit befolyásoló tényezők: mikrokörnyezet és heterogenitás**

### II.6.a. A gyulladáscitokin mikrokörnyezet hatása az MSC-k funkcióira

Egyre gyűlik azoknak az irodalmi adatoknak a sokasága, melyek azt támasztják alá, hogy az MSC-ket körülvevő mikrokörnyezet, legfőképpen a gyulladáscitokin közeg erőteljesen befolyásolja az MSC-k biológiai funkcióját. A gyulladáscitokin közeg eltérően hat az MSC-k differenciációjára, proangiogén funkciójára és immunmodulációjára. A gyulladáscitokin szövet, illetve az aktivált T-sejtek felülűszója gazdag gyulladáscitokin citokinekben (IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$ ) (126). Az immunsejtek által kibocsátott gyulladáscitokin citokinek (115,127) hatását az MSC-k funkcióira a következő két alfejezetben tárgyaljuk.

#### *II.6.a.1. Differenciáció és proangiogén hatás*

A gyulladáscitokin hatását az MSC differenciációjára ellentmondások övezik. Az eddigi tanulmányokban leginkább a TNF- $\alpha$  szerepét vizsgálták a csont differenciációban. Míg egyes szerzők szerint a TNF- $\alpha$  gátolja a csont differenciációt (129-132), mások szerint fokozza azt (133). Ha az MSC-t TNF- $\alpha$  és IL-17 kombinációjával kezeljük, a csont differenciáció szintén erősebb lesz (134). A harmadik álláspont szerint a

TNF- $\alpha$  hatása koncentrációfüggő: alacsony koncentrációban (0,01 ng/mL) serkenti, magas koncentrációban (100 ng/mL) azonban gátolja a csont irányú differenciációt (135). A TNF- $\alpha$  gátolja a zsír és porc irányú differenciációt is, mint ahogy egy másik gyulladáscsökkentő citokin, az IL-1 $\beta$  is (130,136). Az IFN- $\gamma$  hatásáról az MSC differenciációra eddig csak egy tanulmány számolt be, mely szerint IFN- $\gamma$  magas koncentrációban (200 ng/mL) gátolja az MSC-k *in vitro* csont differenciációját, míg alacsonyabb koncentrációban (50 ng/mL) nem (131). A gyulladáscsökkentő környezet differenciációt gátló hatására egy másik bizonyíték az, hogy vad típusú egérbe oltva feltehetőleg az immunrendszer működésének köszönhetően az MSC nem differenciálódik csont irányba, míg tímuszhiányos (nude) egérben igen. Továbbá a tímuszhiányos (nude) egérben az MSC *in vivo* csont differenciációját a T-sejtek oltása gátolta és vad típusú egérben az IFN- $\gamma$ -t és TNF- $\alpha$ -t semlegesítő ellenanyagok fokozták az MSC-k *in vivo* csont differenciációját (131).

Eddig csak egy közleményben találhatunk információt arról, hogy a gyulladáscsökkentő környezet hogyan befolyásolja az MSC-k proangiogén funkcióját. Az IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ -előkezelt MSC-kben megnő a VEGF és hipoxia indukálta faktor-1 $\alpha$  szekréciója, mely hozzájárulhat ahhoz, hogy a citokinekkal előstimulált MSC-k jobban elősegítik a tumor növekedését és az érképződését (137).

#### II.6.a.2. Immunszuppresszív funkció

Az MSC-k immunmoduláló funkciója a „licensing” révén aktiválódik. Mivel erre a kifejezésre megfelelő magyar szakszó nem található a hazai szakirodalomban, a dolgozatban bevezettük a citokinaktiválás fogalmát. A citokinaktiválás folyamata során az MSC-k gyulladáscsökkentő citokinekkel találkoznak, mint az IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  és IL-1 $\alpha/\beta$ , melyek az MSC-keket immunmoduláció tekintetében aktiválják, vagyis gyulladáscsökkentő fenotípus irányába tolják el. Ez utóbbi függ a felhasznált faktor típusától, koncentrációjától és a kezelés időtartamától (128). Egy másik tényező az, hogy a gyulladáscsökkentő citokinek által közvetített immunszuppresszív tulajdonságot serkentő jelek mellett az MSC-k milyen arányban kapnak a gátló fenotípust elfojtó, immunstimuláló jeleket, mint például a Toll-like receptor (TLR) aktiváció. A TLR3 és TLR4 aktiváció csökkentette az MSC-k Jagged1 fehérje expresszióját, ezáltal gátolva a Notch1-függő T-sejt proliferáció gátlást (138). Emellett a TLR3 és TLR4 aktiváció indukálta az IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, a TNF-szerű apoptózis indukáló ligand (TRAIL) gyulladáscsökkentő citokinek és kemokin (C-C motívum) ligand 5 (CCL5) expresszióját (139). Következésképp a TLR3/4 aktiváció az MSC-keket

gyulladásérkítő irányba tolja el. Harmadrészt az MSC-k citokinavatása *in vivo* a lokálisan jelen lévő, egyéni, a patológiás folyamatok során változó citokinkoncentrációknak köszönhetően nehezen szabályozható. Következésképp a különböző betegségmodellekben az MSC-k eltérő időpontokban történő oltása különböző mértékben volt hatásos (140-142). Tehát *in vivo* környezetben a citokinavatás megfelelő végbemeneteléhez azt is figyelembe kell vennünk, hogy a betegség mely fázisában történik az MSC oltás. Az IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$  serkítő hatását az MSC-k immunszuppressziós képességére számos kísérlet igazolja (106,107,111). Ha az MSC-T-sejt kokultúrákban az MSC-k közel 100%-ban gátolják a T-sejtek osztódását, akkor az MSC-k citokinavatásának nincs további gátlásnövelő hatása (91). Polchert és kollégái az *in vitro* eredményeket *in vivo* kísérletben is igazolni tudták: a GVHD egér modelljében az IFN- $\gamma$ -val előaktivált MSC-k oltása hatásosabbnak bizonyult a betegség kialakulásának megelőzésében, mint a kezeletlen MSC-kkel való oltás (143). Az IFN- $\gamma$  döntő szerepét az MSC-k immunszuppresszív aktivitásának a fokozásában többféleképpen is igazolták. Az MSC-k szuppresszív hatását az aktivált T-sejtek osztódására az IFN- $\gamma$  receptor specifikus blokkoló antitest megszünteti (144). Az IFN- $\gamma$ -hiányos egér T-sejtjeinek proliferációját az MSC-k kevésbé gátolják, mint a vad típusú T-sejteket, ellenben a kokultúrához 1,25 ng/mL koncentrációban adott IFN- $\gamma$  jelentősen növeli az MSC-k gátló hatását IFN- $\gamma$  hiányos T-sejtekre (119). Az IFN- $\gamma$  receptor hiányos egérből izolált MSC-k sem gátolják az aktivált T-sejtek osztódását, és a vad típusú MSC-vel ellentétben nem segítik elő a GVHD-s egerek túlélését (115). Ren és munkatársai azt is kimutatták, hogy az MSC-k immunszuppresszív aktivitásának fokozására az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  vagy IL-1 $\alpha/\beta$  kombinációja hatásosabb, mint az egyes citokinek önmagukban (115). A citokinavatás MSC immunszuppressziót serkítő hatása azon alapulhat, hogy az MSC-k IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val történő kezelése immunszuppresszív faktorok mint az IL-6, IL-10, HGF, PD-L1, TGF- $\beta$ 1, PGE2, NO és IDO1, és immunsejteket toborzó kemokinek mint CXCL-9 és CXCL-10 fokozott termelését váltja ki (91,115,145). Ezek a mediátorok MSC kultúrában, aktivált T-sejtekkel vagy gyulladásos citokinekkal történő találkozás hiányában nem, vagy csak nagyon alacsony szinten szekretálódnak. Az egér MSC-ben stimulálatlanul, normál tenyésztési körülmények között az IDO, PD-L1 és PD-L2 kifejeződés hiányzik, a HGF kifejeződés pedig alacsony. Citokinkezelés nélkül a humán és egér MSC iNOS és IDO sem mRNS, sem pedig fehérje szinten nem fejeződik ki (99,110,115,125).

Ezekből az adatokból látszik, hogy míg a gyulladós környezet egyértelműen fokozza az MSC-k immunszuppresszív aktivitását, addig kevés adat áll rendelkezésünkre azzal kapcsolatban, hogy a gyulladós környezet hogyan befolyásolja az MSC-k proangiogén funkcióját, másrészt a gyulladós citokinek a tanulmányok többségében gátolják az MSC-k differenciációját. Ez utóbbi megállapítások alátámasztása azonban még további vizsgálatokat igényel.

#### II.6.b. Az MSC funkciók inter- és intrapopulációs heterogenitása

Az MSC kultúrák heterogenitása kétféleképpen értelmezhető: egyrészt az egyedek között megfigyelt, azaz MSC populációk közti (interpopulációs), másrészt az MSC populáción belüli (intrapopulációs), tehát az egy egyedből izolált MSC kultúra heterogenitását jelenti. A heterogenitás vagy sokféleség tükröződhet a sejtek morfológiájában, kolóniaképzésében, osztódási rátájában, sejtfelszíni markerprofiljában, differenciációs potenciáljában és különböző biológiailag aktív faktorok termelésében (146). A populációk közti heterogenitás egyik példája, hogy 17 donor csontvelőjéből származó MSC-k növekedési üteme, alkalikus foszfatáz aktivitása, illetve csont irányba differenciáltatva a csontspecifikus gének kifejeződése eltérő volt (147). Egy másik példa, hogy 5 különböző egértörzsből izolált csontvelői MSC-k eltérő Sca-1, CD34 és CD106 kifejeződést mutattak és különböző mértékben differenciálódtak csont, porc és zsír irányba (16).

A populáción belüli heterogenitást klonális heterogenitásnak is nevezzük. A klonális heterogenitás vizsgálata visszanyúlik egészen az MSC kutatás gyökereihez, Alexander J. Fridenstein és kollégáinak munkásságához, akik megfigyelték, hogy a csontvelői sztrómális sejtek egy sejtől kialakuló kolóniáinak egy része diffúziós kamrában *in vivo* csont- és porcszövetet formált, míg más kolóniák megőrizték fibroblasztszerű morfológiájukat (1). Ezt követően Pittenger és munkatársai bizonyították elsőként, hogy a humán csontvelői MSC klónok között vannak olyanok, melyek csont, porc és zsír irányba is differenciálhatóak. Ezeket tekintették a közlemény szerzői valódi MSC-nek. A korlátozottabb differenciációs képességgel rendelkező klónokról feltételezték, hogy a fenntartás folyamán elveszítették differenciációs képességüket, vagy valamilyen differenciációs útvonal irányába elkötelezett progenitorsejtekről van szó (148). A klonális heterogenitás vizsgálatát Muraglia és kollégái 185 humán csontvelői MSC klónra terjesztették ki. A klónok egynegyede mindhárom irányba képes volt differenciálódni, a

legtöbbjük pedig csont és porc irányba differenciálódott csak. Olyan klónt nem találtak, amely csont-zsír, porc-zsír, kizárólag porc vagy kizárólag zsír irányba differenciálódott volna (149). Mivel a fenntartás során a klónok elvesztették először a zsír, majd a porc irányú differenciálódási képességüket, feltételezték, hogy a tapasztalt kiindulási heterogenitás háttérében egy csont irányba történő fokozatos elköteleződés áll. Egy későbbi tanulmány ellentmond ennek a hipotézisnek, ugyanis itt a vizsgált 96 humán csontvelői MSC klón között a csont, porc és zsír irányú differenciáció mind a 8 lehetséges kombinációja előfordult. A két donorból izolált klónok közel fele tripotens volt, és a nem differenciálódó klónok aránya elenyésző volt (150). Ezzel szemben az Okamoto és kollégái által vizsgált telomerázzal immortalizált humán klónok többsége elvesztette differenciálódási képességét, és a tripotens klónok száma is csekély volt (151). Más szövetből, mint például a zsírszövetből izolált MSC populáció is különböző potenciálú klónokat tartalmaz, legfőképpen csont-porc és porc-zsír irányba differenciálódókat (152). A fenti adatok rávilágítanak az MSC populációk differenciálódási heterogenitására, mely lehet az intenzív sejtenyésztés, a speciális *in vitro* differenciáltatási protokollok következménye, vagy tükrözheti az MSC populációk természetes módon előforduló különböző irányokba elkötelezett sejtek sokféleségét is.

Az immunosuppresszív funkciót érintő heterogenitást illetően nem rajzolódott ki egységes kép az MSC biológiában, mivel az ilyen irányú vizsgálatok száma csekély és eredményeik ellentmondásosak. Míg egy meglehetősen kevés, specifikusan az egyes klónokra vonatkozó adatot tartalmazó tanulmány szerint az MSC klónok immunmodulációja egyöntetű (113), más csoportok szembeötlő különbségekre hívják fel a figyelmet (115,153,154).



### III. Célkitűzések

A mesenchymalis őssejtek sejterápiás felhasználási köre rendkívül széles, melyek közül az immunológiai kórképek kezelése, illetve a regeneratív medicinában való alkalmazásuk a legígéretesebb területek. Az MSC-k segítik a kóros immunológiai folyamatok révén sérült szövetek regenerációját, illetve a terápia során érvényesülő gyulladáscsökkentő és immunválaszt befolyásoló hatásuk. Az ilyen célból történő felhasználás során az MSC-k gyulladással szembe kerülnek, mely befolyásolhatja az MSC-k terápiás hatékonyságát. A gyulladással szembe kerülő MSC-k immunszuppresszív faktorok mint az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  serkentik számos MSC immunszuppresszív faktor termelését, ezáltal fokozva az MSC-k immunszuppresszív hatékonyságát, ugyanakkor csökkentik differenciálódási potenciáljukat. Az MSC-k felhasználásának sikerességét még egy másik tényező is befolyásolhatja a gyulladással szembe kerülő MSC-k heterogenitása. Régóta ismert, hogy az MSC-k morfológiailag, növekedési és differenciálódási képességüket tekintve egymáshoz viszonyítva heterogén populációk. Ugyanakkor kevés adat áll rendelkezésünkre abban a vonatkozásban, hogy az MSC egy adott populációjának egyedi sejtjei különböznek-e immunreguláló képességük szempontjából, illetve egy sejt szinten a gyulladással szembe kerülő MSC-k hogyan befolyásolja a differenciálódási és immunszabályozó funkciókat. Ennek megértéséhez a következő kérdéseket fogalmaztuk meg:

- 1) Milyen paraméterekkel jellemezhetőek az egy sejtől kiinduló MSC kultúrák eltérései, vagyis az MSC populáció heterogenitása?
- 2) Annak összehasonlítása, hogy a monoklonális MSC sejt kultúrák milyen faktorokon keresztül és milyen mértékben fejtik ki T-sejt proliferációt gátló hatásukat.
- 3) Hogyan befolyásolja a gyulladással szembe kerülő MSC-k az egyedi MSC klónok immunszuppresszív aktivitását és differenciálódási képességét?

## **IV. Anyagok és módszerek**

### **IV.1. Az MSC kultúra izolálása, fenntartása és klónozása**

Az általunk használt MSC-eket Dr. Uher Ferenc (Országos Vérellátó Szolgálat, Össejtbiológiai Laboratórium) izolálta egy vad típusú C57BL/6 egér combcsontjából és sípcsontjából Peister és munkatársai által leírt módszerrel (16).

Az MSC-k fenntartása komplett médiumban (KM) történt, mely DMEM (Gibco®) médium kiegészítve 10% hőinaktivált magzati borjú szérummal (FBS, Gibco®), 2 mM L-glutaminnal (Gibco®) és 100-100 µg/mL penicillin-sztreptomocinnel (PAA). Az MSC-eket 37°C-os, 5% CO<sub>2</sub> koncentrációjú párásított inkubátorban növesztettük.

A monoklonális kultúrák alapításához az egy C57BL/6 egerből származó MSC alapkultúrából a 10. passzázst követően 0,05% tripszin-EDTA (Gibco®) tartalmú médiummal eltávolítottuk az MSC-eket a tenyésztőedény aljáról, és médiummal hígítottuk annyira, hogy 96-lyukú szövettenyésztő lemezre (Orange Scientific) szétosztva minden egyes lyukba statisztikailag 1 sejt kerüljön. CKX41 inverz fénymikroszkópot (Olympus Holding Europa GmbH) használtunk a valóban 1 sejt eredetű klónok kiválogatására. A monoklonális kultúrákat 10% FBS-t és 5% lószérumot (Gibco®) tartalmazó DMEM/F-12 médiumban (Gibco®) növesztettük fel, és az összes MSC morfológiát megtartó klón közül random módon ötöt (MSC2-MSC6) választottunk ki további vizsgálatra.

### **IV.2. Sejtfelszíni markerek vizsgálata áramlási citometriával**

Az MSC kritériumoknak megfelelően meghatároztuk az MSC kultúra sejtfelszíni markermolekula profilját.  $5 \times 10^5$  sejtszuszpenzióba vitt MSC-t jelöltünk fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált anti-CD34 és fikoeritrinnel (PE) konjugált anti-CD44, CD73, CD90 és Sca-1 monoklonális ellenanyagokkal (2. táblázat) fél óráig, 4°C-on és sötétben. A CD3, CD11b, CD45R, Ly6G és TER119 markereket biotinizált elsődleges ellenanyaggal (2. táblázat) jelöltük, majd ezt követően PE-konjugált sztreptavidinnel (Dako) további 30 percig, 4°C-on és sötétben. A 2. táblázatban szereplő ellenanyagok mind patkányban termeltetett, BD Pharmingen által gyártott immunoglobulinok. A jelölést követően a minták fluoreszcencia intenzitását FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson) mértük. Az adatok kiértékelését CellQuest™ (Becton Dickinson) szoftverrel végeztük.

<b>Ellenanyag</b>	<b>Jelölés típusa</b>
anti-egér Sca-1	PE-konjugált
anti-egér CD3	biotinilált
anti-egér CD11b	biotinilált
anti-egér CD34	FITC-konjugált
anti-egér CD44	PE-konjugált
anti-egér CD45R	biotinilált
anti-egér CD73	PE-konjugált
anti-egér CD90	PE-konjugált
anti-egér Ly6G	biotinilált
anti-egér TER119	biotinilált

## 2. táblázat

Az MSC klónok sejtfelszíni markereinek vizsgálatához az MSC-eket sejtszuspenzióba vittük, és a megfelelő antitestekkel (3. táblázat) inkubáltuk fél óráig, sötétben és 4°C-on ( $5 \times 10^5$  sejt/minta). A 3. táblázatban felsorolt elsődleges antitestek szintén patkányban termeltet, BD Pharmingen által gyártott ellenanyagok. A jelölés után mostuk a sejteket immunfluoreszcencia pufferrel (IFB). A konjugálatlan elsődleges ellenanyaggal (anti-CD11b,-CD29,-CD45 és -CD106) jelölt mintákat kecskében termeltetett FITC-konjugált másodlagos ellenanyaggal, a biotinilált anti-CD119-el jelölt mintákat PE- vagy FITC-konjugált sztreptavidinnel (Dako) inkubáltuk fél óráig, sötétben és 4°C-on. A mintákat mostuk, felvettük IFB-ben, és fluoreszcencia intenzitásukat FACSCalibur áramlási citométerrel (Becton Dickinson) mértük. Az adatok kiértékelését CellQuest™ (Becton Dickinson) szoftverrel végeztük. A konjugálatlan ellenanyagokkal és a biotin-konjugált ellenanyaggal jelölt mintákhoz elsődleges ellenanyag nélküli kontrollt, a PE-konjugált ellenanyaggal jelölt mintákhoz festés nélküli kontrollt használtunk.

<b>Ellenanyag</b>	<b>Jelölés típusa</b>
anti-egér Sca-1	PE-konjugált
anti-egér CD11b	konjugálatlan
anti-egér CD29	konjugálatlan
anti-egér CD44	PE-konjugált
anti-egér CD45	konjugálatlan
anti-egér CD73	PE-konjugált
anti-egér CD106	konjugálatlan
anti-egér CD119	biotinilált
anti-patkány IgG	FITC-konjugált

## 3. táblázat

### **IV.3. *In vitro* zsírsejt és csontképző sejt irányú differenciáció**

Az MSC-k zsírsejt irányba történő differenciáltatásához a következő médiumot állítottuk össze: DMEM/F-12 (Gibco<sup>®</sup>), 10% FBS (Gibco<sup>®</sup>), 100-100 µg/mL penicillin-sztreptomicin (PAA), 0,5 mM 3-izobutil-1-metilxantin (IBMX, Sigma-Aldrich), 66 µM indometacin (Sigma-Aldrich), 2 µL/mL inzulin (inzulin lispro injekció, 100 U/mL, Humalog<sup>®</sup>) (148). A sejteket 3 napig tartottuk zsírsejt differenciáltató médiumban, majd 0,05% tripszin-EDTA tartalmú médiummal eltávolítottuk a tenyésztőedény aljáról és 8%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk őket. A zsírsejt differenciációt jelző lipidcseppeket Oil Red O (Sigma-Aldrich) festéssel tettük láthatóvá metilénkék (Sigma-Aldrich) háttérfestés mellett. A zsírsejt differenciációról CKX41 inverz fénymikroszkóphoz csatlakoztatott Camedia C-5060 kamerával fényképeket készítettünk (Olympus Holding Europa GmbH).

Az csontképző sejt irányba differenciáltató médium KM-en alapult, melyet kiegészítettünk 10 mM β-glicerofoszfáttal (Sigma-Aldrich), 50 µg/mL L-aszkorbinsav-2-foszfáttal (Sigma-Aldrich) és 0,1 µM hidrokortizonnal (Sigma-Aldrich) (17). Az MSC-eket 14 napig tartottuk ebben a médiumban, majd 0,05% tripszin-EDTA tartalmú médiummal eltávolítottuk a tenyésztőedény aljáról, 8% formaldehiddel fixáltuk őket, és Alizarin Red S festék (Sigma-Aldrich) oldattal (pH 4,1) tettük láthatóvá a csontosodási göcökben felhalmozódó kalciumot. A csontképző sejt differenciációról CKX41 inverz fénymikroszkóphoz csatlakoztatott Camedia C-5060 kamerával fényképeket készítettünk.

### **IV.4. Zsírsejt differenciáció vizsgálata AdipoRed™ reagenssel és citofluorimetriával**

Az MSC-eket 3 napig tartottuk zsírsejt differenciáltató médiumban, majd szuszpenzióba vittük és 4%-os paraformaldehiddel (Sigma-Aldrich) fixáltuk őket. A zsírsejt differenciációt jelző lipidcseppeket fluoreszcensen jelöltük AdipoRed™ reagenssel a gyártó által javasolt körülmények mellett (Lonza). A fluoreszcens lipidcseppekről Axioskop 2 Mot fluoreszcens mikroszkóppal (Carl Zeiss) EC Plan-Neofluar 20x/0.5 objektívvel (Carl Zeiss) készítettünk felvételeket. A zsírsejtekben felhalmozódó lipidek mennyiségi meghatározásához a fent leírt módon jelöltük a sejteket AdipoRed™-del ( $5 \times 10^5$  sejt/minta). A sejtek fluoreszcencia intenzitását FACSCalibur áramlási citométerrel mértük, az adatok kiértékelését CellQuest™ szoftverrel végeztük.

#### **IV.5. A növekedés vizsgálata**

$2 \times 10^4$  MSC-t ültettünk ki 35 mm átmérőjű sejtenyésző csészébe (Greiner), minden számolási napra 2-2 párhuzamossal. A kiültetést követő 2-6. napon 0,05% tripszin-EDTA tartalmú médiummal távolítottuk el a sejteket a tenyésztőedényről, az élő sejtek elkülönítésére a sejteket tripánkék festékkoldattal festettük és Bürker kamrában számoltuk. Az MSC klónok populáció kétszereződési idejét (population doubling time, PDT) a következő képlet alapján számoltuk ki:

$$PDT = t_2 - t_1 \div [(\log n_2 - \log n_1) \times 3.32]$$

ahol  $t_1$  és  $t_2$  a kiültetéstől eltelt idő (óra) két külön számolási időpontban, melyek között a sejtek növekedése lineáris fázisban volt,  $n_1$  és  $n_2$  pedig a sejtszám  $t_1$ , illetve  $t_2$  időpontban. A PDT tehát megadja, hogy az adott sejtpopuláció sejtszáma mennyi idő alatt duplázódik meg.

#### **IV.6. *In vitro* prevascularis struktúra teszt**

A prevascularis teszt során az MSC-eket és a H5V (155) egér szív endotélsejteket (mely utóbbit Dr. Vizler Csaba ajándékozott csoportunknak, MTA SZBK, Biokémiai Intézet) 24-lyukú sejtenyésző lemezen együtt-tenyésztésbe (kokultúrába) vontunk. A kokultúrában a sejtek aránya 1 : 1 volt, a sejtszám pedig külön-külön  $2 \times 10^4$ /lyuk. Kontrollként egyező számú, monokultúrában tartott sejteket használtunk. A kokultúra 3. napján 5 véletlenszerűen kiválasztott, nem átfedő látómezőt lefényképeztünk Olympus Cell-R fluoreszcens mikroszkóppal (Olympus Holding Europa GmbH), melyhez UPlanSApo 4x/0.16 objektívet használtunk. A fényképeken a prevascularis struktúrák hosszát CellR Imaging szoftver segítségével becsültük meg (Olympus Holding Europa GmbH).

#### **IV.7. *In vitro* T-sejt proliferációs teszt**

Kilencvenhat-lyukú lemezre lyukanként  $1,25 \times 10^3$ - $2 \times 10^4$  MSC-t szélesztettünk 100  $\mu$ L KM-ben, az MSC sejtszámot az egyes kísérletekhez tartozó ábraalírásban tüntettük fel. Balb/C egerből izoláltuk a mesenterialis, inguinalis és brachialis nyirokcsomókat, melyeket hibridóma lapáttal RPMI (Gibco®) médiumban

szétnyomkodtunk, ezáltal a bennük lévő leukocitákat felszabadítottuk a médiumba. Egyes kísérletekhez az így nyert leukocitákból T-sejteket szeparáltunk. A leukocitákat vagy szeparált T-sejteket centrifugálással összegyűjtöttük, 5% FBS-t tartalmazó foszfáttal pufferezt fiziológiás sóoldatban (PBS) szuszpendáltuk úgy, hogy a sejtkoncentráció  $2 \times 10^6$  sejt/mL volt. A leukocitákhoz  $2,5 \mu\text{M}$  koncentrációban karboxifluorescein-diacetát-szukcimidilésztert (CFSE, CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit, Life Technologies) adtunk, és a sejteket szobahőmérsékleten, sötétben 5 percig inkubáltuk. Ezt követően a sejteket RPMI-vel kétszer mostuk, és a már kiültetett MSC-hez lyukanként  $2 \times 10^5$  leukocitát adtunk  $100 \mu\text{L}$  10% FBS-t,  $50 \mu\text{M}$   $\beta$ -merkaptotetanolt (Sigma-Aldrich) tartalmazó RPMI médiumban. Így a kokultúra össztérfogata  $200 \mu\text{L}$  volt. A leukociták aktivációját a kokultúrához adott  $5 \mu\text{g/mL}$  Concanavalin A (ConA, Sigma-Aldrich) növényi lektinnel, a szeparált T-sejtek aktivációját anti-CD3/CD28 ellenanyaggal (Dynabeads, Invitrogen) végeztük. Specifikus inhibitorokkal végzett kísérletekben a nitrogén-monoxid szintáz 2 (NOS2), a prosztaglandin-endoperoxid szintáz 2 (PTGS2) vagy az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzim működését  $1 \text{ mM}$  NG-metil-L-arginin-acetáttal (L-NMMA, Sigma-Aldrich),  $10 \mu\text{M}$  indometacinnal (Sigma-Aldrich), illetve  $1 \text{ mM}$  1-metil-triptofánnal (1-MT, Sigma-Aldrich) gátoltuk. Hetvenkét óra elteltével a le nem tapadó leukocitákat PBS-sel mostuk, és felvettük őket  $10 \mu\text{g/mL}$  propídium-jodiddal (Sigma-Aldrich) kiegészített IFB-ben. A sejtek fluoreszcencia intenzitását FACSCalibur áramlási citométerrel mértük, az adatok kiértékelését ModFit LT™ Version 2.0. szoftverrel (Verity Software House, Inc) végeztük.

Egyes kísérletekben az MSC-eket 24 óráig  $100 \text{ ng/mL}$  egér rekombináns IFN- $\gamma$ -val (R&D Systems) és  $50 \text{ ng/mL}$  TNF- $\alpha$ -val előkezeletük (melyet Dr. Vizler Csabától, az MTA SZBK Biokémiai Intézetéből kaptunk) (156). A kezelést követően a sejteket kétszer KM-mel mostuk, majd a T-sejt proliferációs tesztet a fent leírtak alapján vittük véghez.

#### **IV.8. T-sejt szeparáció és aktiválás**

Balb/C egérből a fent leírt módon izoláltuk a mesenterialis, inguinalis és brachialis nyirokcsomókat. Az így nyert leukocitákból T-sejteket szeparáltunk BD IMag™ T lymphocyte Enrichment Set DM kit és IMagnet™ készülék segítségével (BD Biosciences). Ehhez először a sejteket ( $2 \times 10^6/\text{mL}$ ) PBS-ben szuszpendáltuk, és hozzáadtuk a biotinilált monoklonális ellenanyag koktélt ( $5 \mu\text{L}/10^6$  leukocita), mely a T-sejtektől különböző leukocitákat ismeri fel. A sejteket 15 percig, sötétben és jégen inkubáltuk. A jelölés után a

sejteket mostuk, centrifugálással ülepitettük, és hozzáadtuk a gyártó által biztosított sztreptavidinnel borított mágneses részecskéket ( $5 \mu\text{L}/10^6$  leukocita). Erőteljes keverés után a sejteket fél óráig  $4^\circ\text{C}$ -on tartottuk. A sejteket tartalmazó Falcon csövet 8 percre a BD IMagnet™ mágneses készülékre helyeztük. A T-sejteket tartalmazó felülűszót összegyűjtöttük, és a mágneses részecskékhöz új médiumot adtunk. Megismételtük még egyszer a mágneses szeparálást, és a felülűszót az előzőhöz hozzáadtuk.

A szeparált T-sejtek aktivációjához a sejteket ( $2 \times 10^5$ /lyuk) kitettük 96-lyukú sejtenyésző lemezre, és hozzáadtunk  $2 \mu\text{L}/\text{lyuk}$  anti-CD3/CD28 ellenanyaggal borított mágneses gyöngyöt (Dynabeads, Invitrogen).

#### **IV.9. Citokimmérés felülűszóból**

Balb/C egerből a fent leírt módon izoláltuk a mesenterialis, inguinalis és brachialis nyirokcsomókat. Az így nyert leukocitákból T-sejteket szeparáltunk és a sejteket a fent leírt módon 72 órán keresztül anti-CD3/CD28 ellenanyagokkal aktiváltuk. Hetvenkét óra múlva a T-sejtek felülűszóját összegyűjtöttük.

Az IL-2,4,5, IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$  fehérjék detektálását a Cytometric Bead Array és Mouse Th1/Th2 Cytokine kit (BD Biosciences) segítségével végeztük mintánként  $50 \mu\text{L}$  felülűszóból. Az  $50 \mu\text{L}$  felülűszóhoz hozzáadtuk a gyöngyökhöz kovalensen kötött, PE-konjugált anti-IL-2, -IL-4, -IL-5, -IFN- $\gamma$  és anti-TNF- $\alpha$  ellenanyagokat tartalmazó oldatot és a detektációs reagenst. Két órán keresztül inkubáltuk sötétben és szobahőn. Ezt követően a gyöngyöket mostuk, centrifugálással ülepitettük, mosópufferben felvettük, és fluoreszcencia intenzitásukat FACSCalibur áramlási citométerrel mértük. Az adatok kiértékelését CellQuest™ szoftverrel végeztük. A felülűszókban a citokinek mennyiségét a gyártó által biztosított sztenderd sor alapján kalibráltuk.

#### **IV.10. Western blot analízis**

Az MSC-eket RIPA pufferben lizáltuk ( $10^7$  MSC/mL puffer). A lizátumot 10%-os SDS-poliakrilamid gélen Page Ruler™ előre festett fehérje molekulásúly marker mellett (Fermentas) futtattuk, majd az elválasztott fehérjéket elektromos árammal (20V feszültséggel, 16 órán át és  $4^\circ\text{C}$ -on) nitrocellulóz membránra (Whatman® Protran®) transzferáltuk. A membránt 1 órán keresztül 3% zselatint (Sigma-Aldrich) és 0,05% Tween® 20-at tartalmazó (Sigma-Aldrich) Tris pufferezt sóoldatban (TBST) szobahőn telítettük. A membrán szabad kötőhelyeinek telítése után  $4^\circ\text{C}$ -on 1-1 órán keresztül a

laborunkban előállított 2500× hígított nyúl anti-Gal-1 ellenanyaggal (71), majd 3× TBST mosás után 3000× hígított HRP-konjugált anti-nyúl immunoglobulinnal (Dako) inkubáltuk a membránt. Felviteli kontrollként 10000× hígított nyúl anti-β-aktin ellenanyagot használtunk (Abcam). Az immunreaktív fehérjéket kemilumineszcens Amersham™ ECL Prime reagenssel (GE Healthcare Life Sciences) hívtuk elő, és CCD Chemi 410 kamerával felszerelt EC3 Imaging System munkaállomás segítségével készítettünk róla felvételt (Ultra-Violet Products). A felvételen a sávok denzitását VisionWorks®LS Image Acquisition and Analysis szoftverrel (Ultra-Violet Products) analizáltuk.

#### IV.11. Kvantitatív valós idejű (real-time) polimeráz láncreakció (qRT-PCR)

Az MSC-t ( $10^5$ /minta) 35 mm átmérőjű sejtenyésző csészébe KM médiumba ültettük ki. Másnap a médiumot 100 ng/mL IFN- $\gamma$ -val és 50 ng/mL TNF- $\alpha$ -val kiegészített friss KM-re cseréltük, és a sejteket további 24 óráig inkubáltuk. Kontrollként azonos időben kiültetett, KM médiumban tartott sejteket használtunk. Az inkubációs idő leteltével totál RNS-t izoláltunk az MSC-ből Nucleospin RNA II kittel (MACHEREY-NAGEL GmbH) a gyártó utasításai szerint. A másolati DNS (cDNS) átírását RevertAid H Minus cDNS szintézis kittel (Thermo Fisher Scientific) végeztük 2  $\mu$ g totál RNS-ből kiindulva a gyártó utasításai szerint. A qRT-PCR-t Rotor Gene3000 készülékben (Corbett Life Science) végeztük. A PCR reakcióhoz a *Ptgs2*, *Nos2* és *Ido1* gének esetén TaqMan® univerzális génexpressziós master mixet (Life Technologies), az angiopoietin-1 (*Angpt1*), *Vegfa*, *Tgfb1*, galektin-1 (*Lgals1*), Runt-szerű transzkripció faktor-2 (*Runx2*), csont Gla fehérje (bone gla protein, *Bglap*) és szekretált foszfoprotein-1 (*Spp1*) gének esetén AccuPower® 2X Greenstar qPCR master mixet (Bioneer) használtunk. A vizsgált gén (GOI) expresszióját a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (*Gapdh*) referencia gén kifejeződéséhez viszonyítottuk oly módon, hogy a vizsgált gén relatív expresszióját a referencia génhez képesti áttörési ciklusaik (Ct) különbségeként ( $\Delta$ Ct) ábrázoltuk:  $\Delta$ Ct = Ct<sub>Gapdh</sub> - Ct<sub>GOI</sub>. A relatív mRNS különbségeket a  $2^{\Delta\Delta$ Ct képlet alkalmazásával kaptuk, ahol a  $\Delta\Delta$ Ct = (Ct<sub>Gapdh</sub> - Ct<sub>GOI</sub>)<sub>egyik MSC klón</sub> - (Ct<sub>Gapdh</sub> - Ct<sub>GOI</sub>)<sub>másik MSC klón</sub> a klónok génexpressziós szintjének meghatározása esetén, vagy  $\Delta\Delta$ Ct = (Ct<sub>Gapdh</sub> - Ct<sub>GOI</sub>)<sub>kezelt</sub> - (Ct<sub>Gapdh</sub> - Ct<sub>GOI</sub>)<sub>kontroll</sub> a génexpressziós változás környezeti vizsgálatokor. A *Ptgs2* (Mm00478374\_m1), *Nos2* (Mm01309902\_m1), *Ido1* (Mm00492586\_m1\*) és *Gapdh* (Mm99999915\_g1) gének vizsgálatához kereskedelmi forgalomban lévő TaqMan® génexpressziós próbákat vásároltunk, míg az *Angpt1*, *Bglap*, *Gapdh*, *Lgals1*, *Runx2*, *Spp1*,



*Tgfb1* és *Vegfa* génekhez a Roche által ingyenesen hozzáférhetővé tett Universal Probe Library Assay Design program alapján terveztünk primereket (4. táblázat).

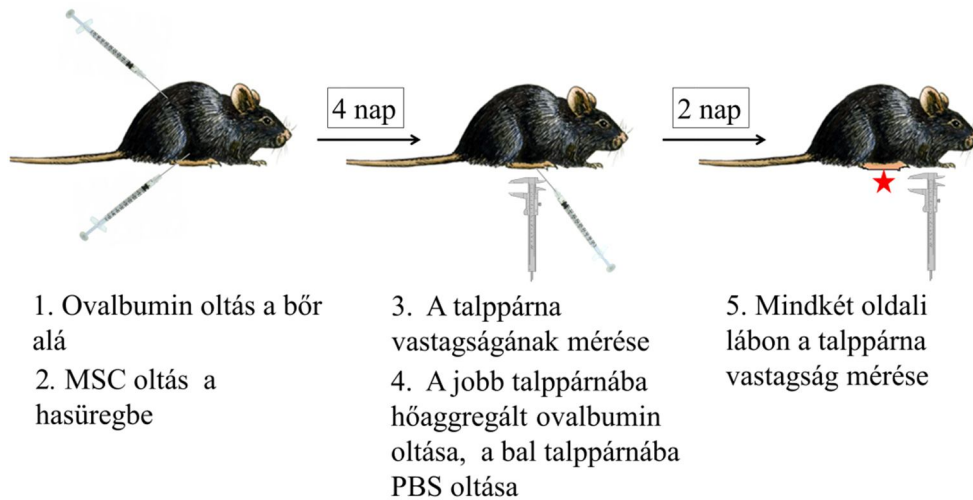
Gén	Primer	Szekvencia
<i>Angpt1</i>	forward	5'-cggatttctcttccagaaac-3'
	reverz	5'-tccgacttcataatttccacaa-3'
<i>Bglap</i>	forward	5'-agactccggcgtacctt-3'
	reverz	5'-ctcgtcacaagcagggttaag-3'
<i>Gapdh</i>	forward	5'-ttgatgtagtgggtctcg-3'
	reverz	5'-agcttgcatcaacgggaag-3'
<i>Lgals1</i>	forward	5'-ctctcgggtggagtcttctg-3'
	reverz	5'-ggttgagattcaggttgctg-3'
<i>Runx2</i>	forward	5'-agtagccaggtcaacgatctga-3'
	reverz	5'-gactgttatggtcaaggtgaaacttt-3'
<i>Spp1</i>	forward	5'-ggaggaaaccagccaagg-3'
	reverz	5'-tgccagaatcagtcactttcac-3'
<i>Tgfb1</i>	forward	5'-tggagcaacatgtggaact-3'
	reverz	5'-cagcagccggttaccag-3'
<i>Vegfa</i>	forward	5'-aaaaacgaaagcgaagaaa-3'
	reverz	5'-tttctccgctctgaacaagg-3'

4. táblázat

#### IV.12. Késői típusú túlérzékenységi reakció kiváltása

A késői típusú túlérzékenységi reakció (Delayed Type Hypersensitivity, DTH) kiváltásához antigénként csirke tojásfehérje albumint, ún. ovalbumint (OVA, Sigma-Aldrich) használtunk. A kísérlet menetét a 4. ábra szemlélteti. A szenzibilizációhoz 1 mg/mL koncentrációban oldottunk OVA-t PBS-ben, és komplett Freund-adjuvánnal (CFA, Sigma-Aldrich) 1 : 1 arányban emulziót készítettünk. Hat-nyolc hetes hím C57BL/6 egereket immunizáltunk állatonként 100 µg OVA-t tartalmazó emulziót oltva az állatok bőre alá. Kontrollként CFA-val emulzionált PBS-t oltottunk. Ezt követően állatonként 10<sup>6</sup> MSC-t 200 µL PBS-ben oltottunk az állatok hasüregébe. Az MSC-vel nem oltott állatokba 200 µL PBS-t oltottunk. Négy nap múlva a DTH reakció kiváltásához az állatok jobb hátsó talppárnájába 12,5 µL PBS-ben oldott 250 µg hőaggregált ovalbumint oltottunk, a kontroll bal hátsó talppárnájába pedig 12,5 µL PBS-t. A talppárnák oltását közvetlenül megelőzően, illetve 48 órával az oltás után mértük a talppárnák vastagságát mindkét hátsó lábbon. Az ovalbumin által kiváltott DTH reakció során fellépő talppárna relatív duzzanatát (RD) a

következő képlet alapján számítottuk:  $RD = (J_{48 \text{ óra}} - B_{48 \text{ óra}}) - (J_0 \text{ óra} - B_0 \text{ óra})$ , ahol J az OVA-val oltott jobb hátsó talppárna vastagságát, B a PBS-sel oltott bal hátsó talppárna vastagságát jelenti mm-ben megadva.



4. *ábra. A DTH kísérlet menete*

#### IV.13. Statisztikai elemzés

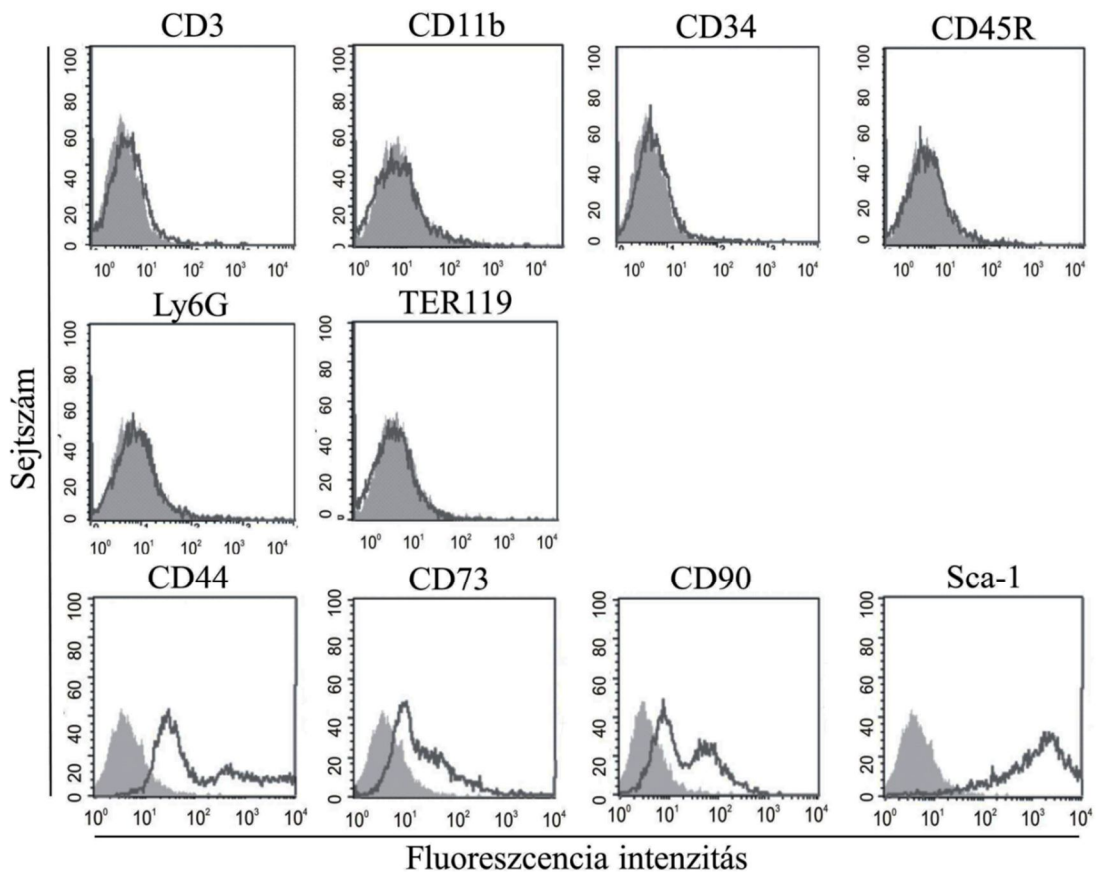
Az eredmények statisztikai elemzéséhez a GraphPad Prism 6.03 (GraphPad Software) szoftvert használtuk. Azoknál a kísérleteknél (az összes, kivéve 24. ábra), melyek több kísérleti csoportból álltak, az adatokon egyutas varianciaanalízist végeztünk (Analysis of Variance, ANOVA). Abban az esetben, ha az ANOVA szignifikáns különbséget mutatott ( $p < 0,05$ ), akkor az egyes kísérleti csoportok közötti különbségek többszörös összehasonlításához a Fisher-féle Legkisebb Szignifikáns Különbség (least significant difference, LSD) *post hoc* tesztet végeztünk. A 24. ábránál, mely csak két kísérleti csoportot tartalmazott a Student-féle T-tesztet alkalmaztuk. Egy különbséget statisztikailag akkor tekintettünk szignifikánsnak, ha a  $p$  érték kisebb volt mint 0,05 (\*:  $p < 0,05$ ; \*\*:  $p < 0,01$ ; \*\*\*:  $p < 0,001$ ). Az ábrákon több kísérletben nyert adatok átlagát jelenítettük meg, és megadtuk az adatok standard eltérését (standard deviáció, SD) vagy az átlag standard hibáját (standard error of the mean, SEM).

## V. Eredmények

### V.1. Az MSC-k jellemzése

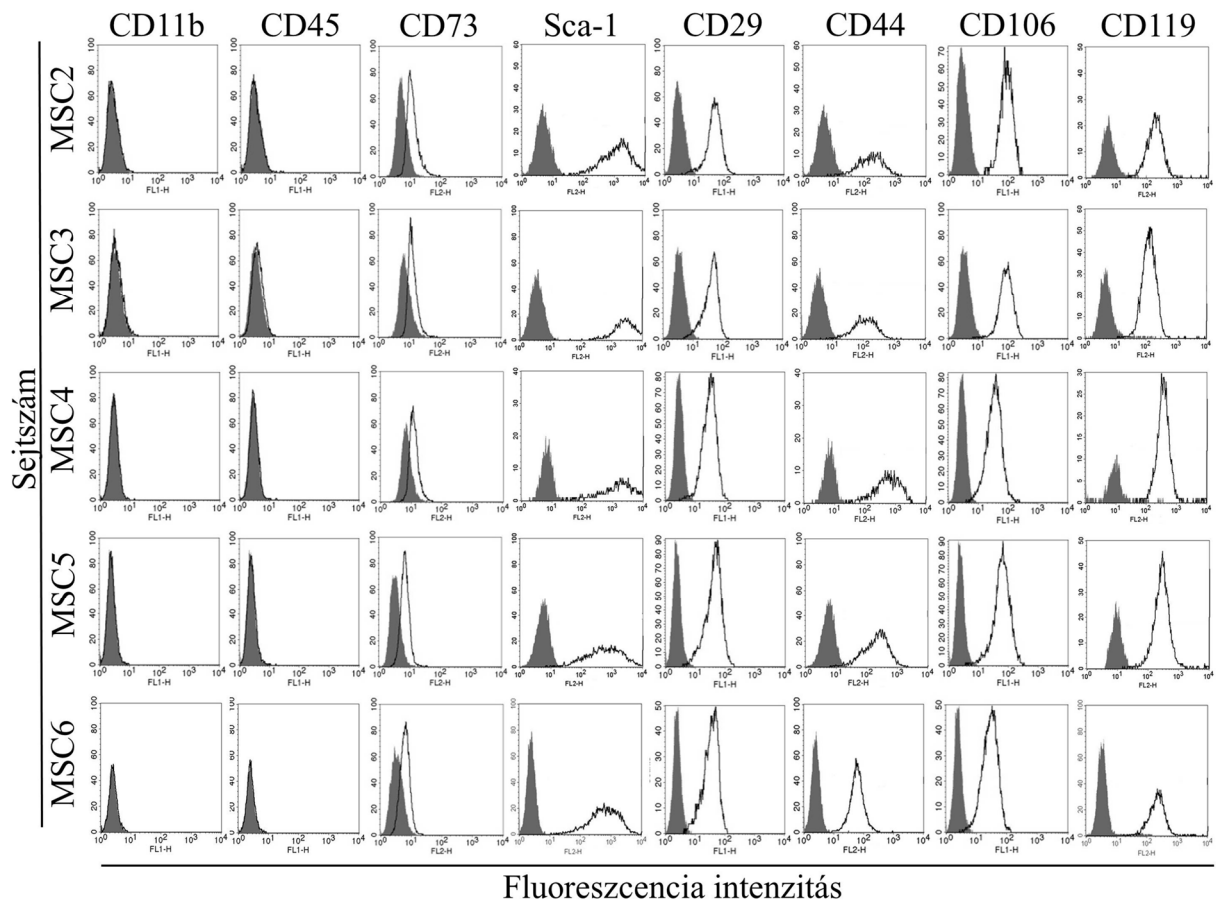
#### V.1.a. Sejt felszíni markerek vizsgálata

A klónozatlan, heterogén MSC kultúra nem rendelkezik vérsajtfejlődési sorokra jellemző CD3, CD11b, CD34, CD45R, Ly6G és TER119 és más sejt vonalakra jellemző specifikus sejt felszíni markermolekulákkal, ellenben hordozza az MSC-kre jellemző CD44, CD73, CD90 és Sca-1 molekulákat (5. ábra). Az eredmények értelmében a kultúra sejt felszíni markere alapján MSC-nek nevezhető.



**5. ábra.** Az MSC kultúra sejt felszíni markermolekulái. Az MSC-t anti-CD3, CD11b, CD45R, Ly6G, TER119, CD44, CD73, CD90 és anti-Sca-1 ellenanyagokkal (sötét vonal) jelöltük, és áramlási citometriával mértük a sejtek fluoreszcencia intenzitását. A CD34, CD44, CD73, CD90 és Sca-1 jelölés negatív kontrolljaként nem festett sejteket használtunk (szürke hisztogram), míg a CD3, CD11b, CD45R, Ly6G és TER119 jelölés negatív kontrollja az elsődleges ellenanyag nélkül adott PE-konjugált sztreptavidin volt (szürke hisztogram).

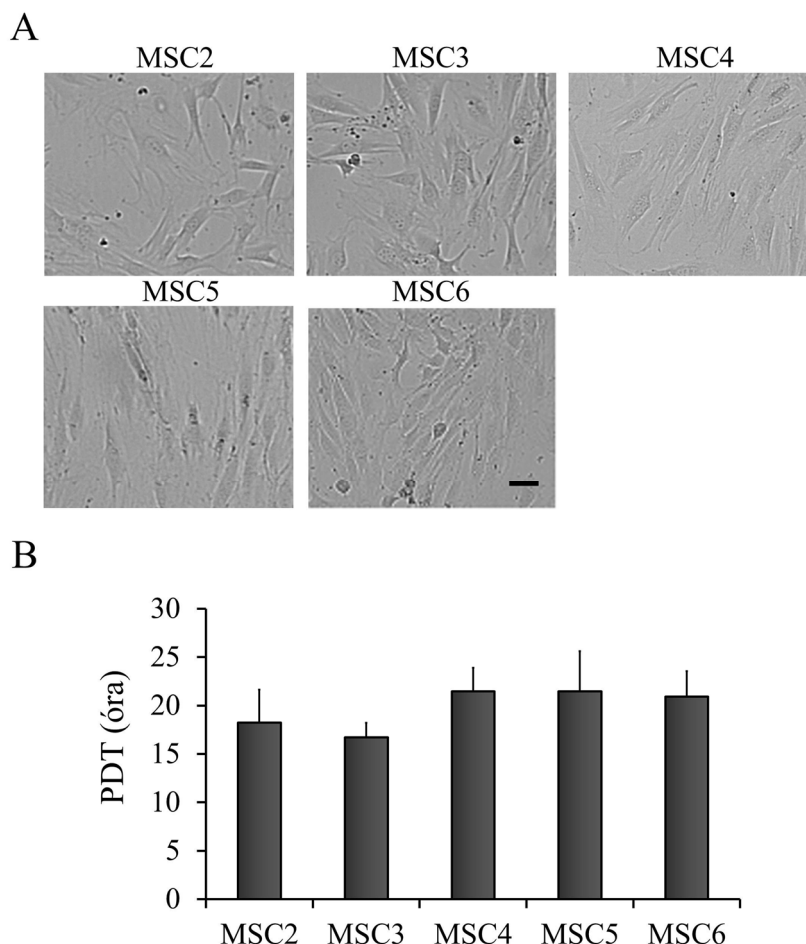
Az MSC kultúrából hígítással módszerrel egy sejt eredetű klónokat hoztunk létre (MSC2-6). A kiindulási MSC kultúrához hasonlóan egyik MSC klón sem hordozta a vérsajtfejlődési sorokra jellemző CD11b és CD45 markereket, mindazonáltal mindegyik klón 100%-ban kifejezte az MSC-kre jellemző CD73, Sca-1, CD29, CD44, CD106 és CD119 markereket. A CD73 alacsony, míg a Sca-1, CD29, CD44, CD106 és CD119 magasan fejeződött ki a sejtek felszínén (6. ábra).



**6. ábra. A monoklonális MSC vonalak sejtfelszíni markermolekulái.** Az MSC2-6 klónokat anti-CD11b, -CD45 -CD73, -Sca-1, -CD29, -CD44, -CD106 és anti-CD119 ellenanyagokkal (fekete vonal) jelöltük, és áramlási citometriával analizáltuk a sejteket. A CD73, Sca-1, CD44 és CD119 jelölés negatív kontrolljaként nem festett sejteket használtunk (szürke hisztogram), míg a CD11b, CD45, CD29 és CD106 jelölés negatív kontrollja az elsődleges ellenanyag nélkül adott másodlagos ellenanyag volt (szürke hisztogram).

### V.1.b. Morfológia és növekedési tulajdonságok

Az MSC2-MSC6 klónok az MSC-kre jellemző 100% sejtdenzitású (konfluenciájú) kultúrában fibroblaszt-szerű, kitapadó, megnyúlt, orsó alakú sejtek (nincs bemutatott adat), alacsonyabb sejtdenzitás esetén kiterülő, hosszú nyúlványokat képező sejtek (7./A ábra). Az MSC klónok átlagos populáció kétszereződési ideje 16 és 21 óra között változott (7./B. ábra).

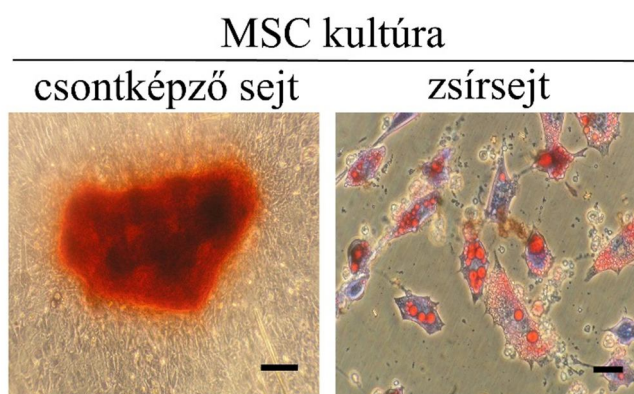


**7. ábra. Az MSC klónok morfológiája és növekedése.** A.)  $2 \times 10^4$  MSC-t ültettünk ki 24-lyukú lemezre, és 2 napig KM médiumban növesztettük őket, majd a sejteket Olympus Cell-R fluoreszcens mikroszkóphoz csatlakoztatott kamerával fényképeztük. Mércse =  $50 \mu\text{M}$ . B.)  $2 \times 10^4$  MSC-t ültettünk ki 35 mm átmérőjű Petri-csészébe. A kiültetést követő 2.-6. napon felszedtük és számoltuk a sejteket. A növekedési görbe lineáris fázisában mért sejtszámokból a az *Anyagok és módszerek IV.5. alfejezetében szereplő képlet alapján számítottuk a sejtek PDT-jét* ( $t_1 = 48$  óra;  $t_2 = 96$  óra). A grafikon 2-2 párhuzamossal végzett 2 független kísérlet átlagát (+SD) mutatja be.

### V.1.c. *In vitro* csontképző és zsírsejt irányú differenciálódás

A klónozatlan heterogén MSC kultúra *in vitro* csontképző sejt irányú differenciálódását speciális faktorokkal indukáltuk. A sejtek csontosodási góckba tömörültek és kalciumban gazdag ún. mineralizált extracelluláris mátrixproteineket termeltek. A 14 nap alatt kialakuló csontosodási góckok Alisarin Red S-sel barnásvörösen festődnek (8. ábra).

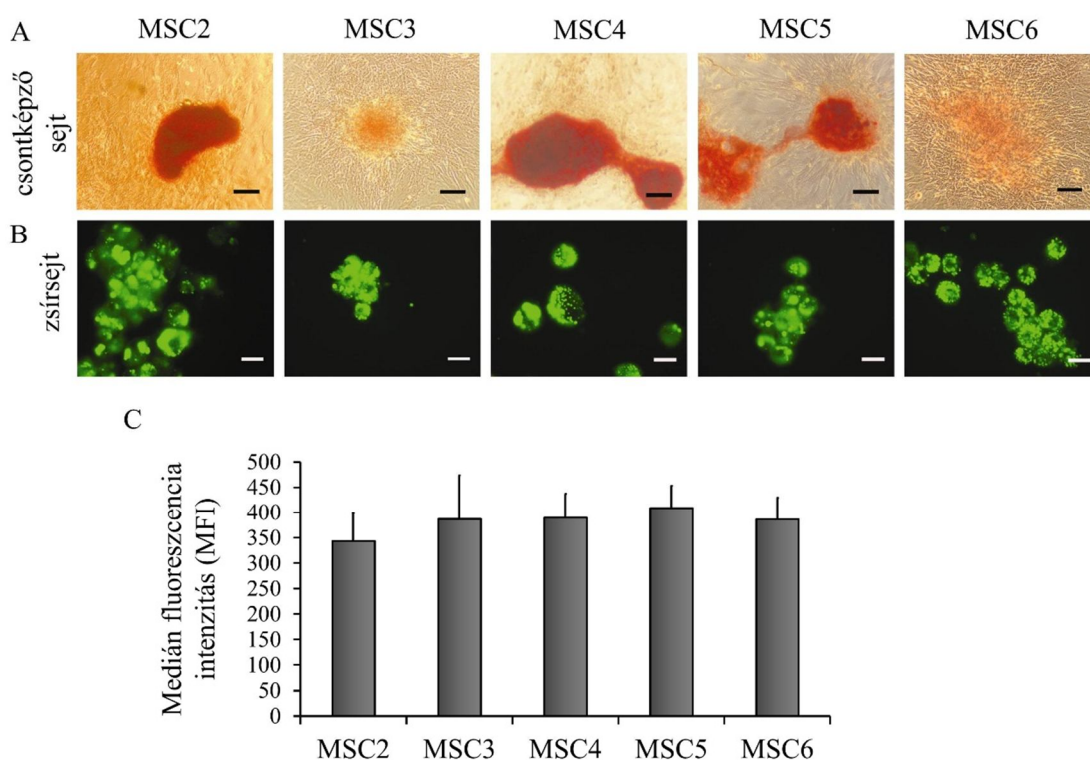
A zsírsejt irányú differenciálódást stimuláló faktorok jelenlétében az MSC kultúra 3 nap alatt kerekded, lipidcseppekkel teli sejtekké alakult. A lipidcseppeket Oil Red O festéssel tettük láthatóvá (8. ábra).



**8. ábra.** Az MSC kultúra *in vitro* csontképző sejt és zsírsejt irányú differenciációja. Az *in vitro* csontképző sejt irányba differenciáltatott MSC kultúrákban a differenciáció 14. napján a csontosodási góckokban felhalmozódó kalciumot Alisarin Red S-sel megfestettük (bal oldali kép). A zsírsejt irányba differenciáltatott MSC-ben a kialakuló lipidcseppeket a 3. napon Oil Red O festéssel láthatóvá tettük (jobb oldali kép). A csontképző sejt és zsírsejt differenciációról CKX41 mikroszkóphoz kapcsolt Olympus Camedia C-5060 kamerával készítettünk fényképeket. Mércse = 50  $\mu$ M

Speciális faktorokkal az MSC klónok *in vitro* csontképző sejt differenciációja indukálható volt, az indukciót követő 14. napon Alisarin Red S festés alapján a csontosodási góckok mindegyik klón esetén megjelentek, az MSC2, MSC4 és MSC5 erőteljes, míg az MSC3 és MSC6 gyenge *in vitro* csontképző sejt differenciációt mutatott (9/A. ábra).

Az MSC klónok mindegyike differenciálható volt zsírsejt irányba (9/B. ábra). A klónok differenciálódási képességét a specifikus AdipoRed™ lipidcsepp festéssel mennyiségileg összevethetővé tettük. A festés alapján a klónok differenciálódási képessége egyforma volt, mivel a fluoreszcensen festett zsírsejtekben felhalmozódó lipidek áramlási citométerrel történő detektálása azt mutatta, hogy az egyes klónok közel azonos mennyiségű neutrális lipidet halmoztak fel a differenciáció folyamán (9/C. ábra).



**9. ábra.** Az MSC klónok *in vitro* csontképző sejt és zsírsejt irányú differenciációja. A.) Az *in vitro* csontképző sejt irányba differenciáltatott MSC klónokban a differenciáció 14. napján Alizarin Red S-sel megfestettük a csontosodási góciókban felhalmozódó kalciumot. A góciókról CKX41 mikroszkóphoz kapcsolt Olympus Camedia C-5060 kamerával készítettünk fényképeket. B.) A zsírsejt irányba differenciáltatott MSC-ben a 3. napon AdipoRed™ fluoreszcens festéssel láthatóvá tettük a kialakuló lipidcseppeket és Axioskop 2 Mot fluoreszcens mikroszkóppal lefényképeztük a sejteket. Mércse = 50  $\mu$ M. C.) A fluoreszcensen jelölt zsírsejtekben felhalmozott lipidek mennyiségét áramlási citometriával (FACSCalibur) hasonlítottuk össze. A grafikon 5 független kísérlet átlagát (+SD) jeleníti meg.



#### V.1. d. *In vitro* proangiogén hatás

Az MSC-k az endotélsejtekkel kapcsolatban lévő periendotélialis sejtek előalakjának tekinthetők (21). Az endotél- és periendotélialis sejtek kölcsönhatásának vizsgálatára laborunkban egy olyan módszert állítottunk be, mely során a vad típusú klónoztalan, heterogén MSC-t és H5V egér szív endotélsejteket együtt-tenyésztünk (kokultúra). Különböző sejtarányok (MSC : endotélsejt = 5 : 1, 1 : 1, 1 : 5) közül az 1 : 1 arány bizonyult a legoptimálisabbnak. A kokultúra során az 1 : 1 arányban lévő MSC és endotélsejtek 3 nap alatt spontán módon sajátos hálózatokba, ún. prevascularis struktúrákba rendeződtek össze (10. ábra). A struktúrák létrehozásában mindkét sejtípus egyaránt részt vett, ugyanakkor önmagában az MSC kultúra és a H5V nem képzett struktúrákat (10. ábra). Kimutattuk, hogy az MSC-k által termelt proangiogén lektin, a Gal-1 meghatározó faktor a prevascularis struktúrák kialakulásában, ugyanis a Gal-1-deficiens MSC szignifikánsan kisebb mértékben támogatja a H5V-vel alkotott struktúrák képződését (71).

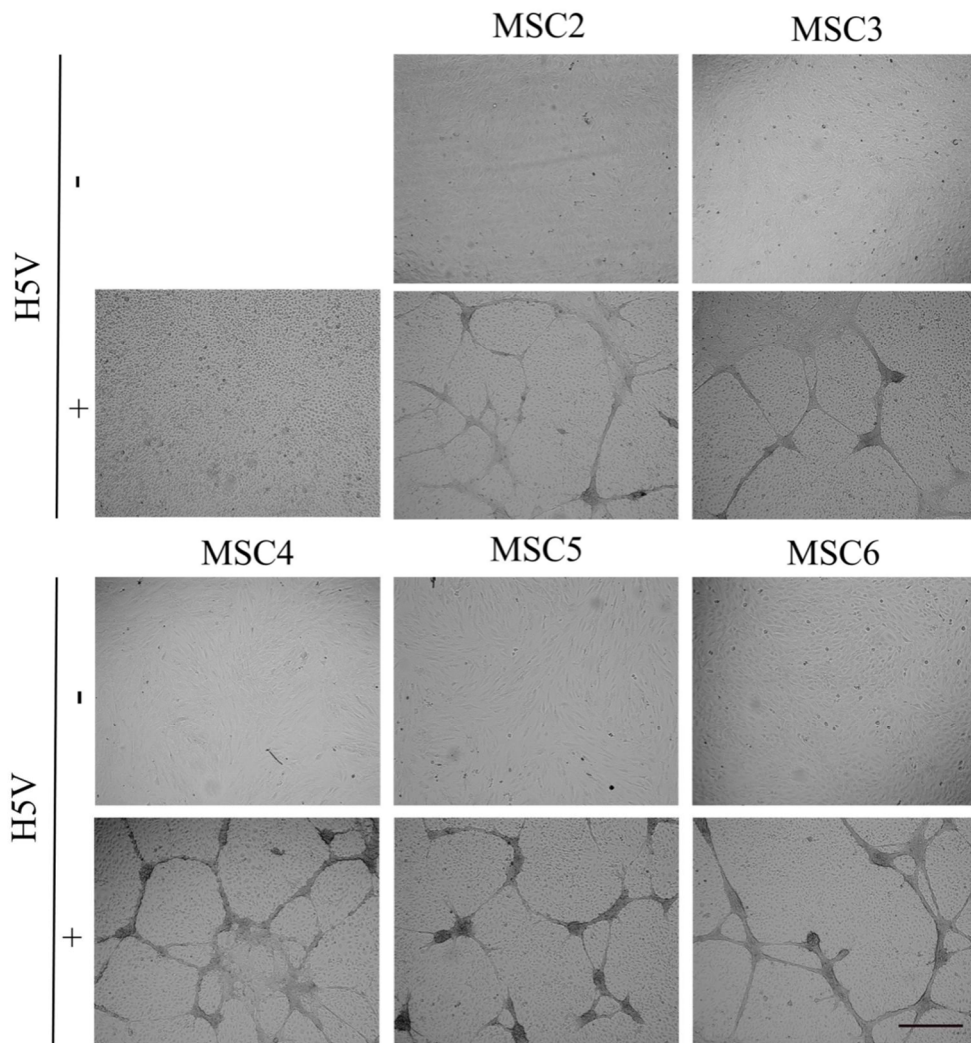


**10. ábra.** *Az MSC-k támogatják a prevascularis struktúrák képződését.  $2 \times 10^4$  MSC-t és  $2 \times 10^4$  H5V-t 3 napig tenyésztettünk együtt. A kokultúrában képződő prevascularis struktúrákat Olympus Cell-R fluoreszcens mikroszkóppal 4x-es UplanSApo objektívvel lefényképeztük. Az ábrán reprezentatív képek láthatóak. Mércse = 500  $\mu$ M*

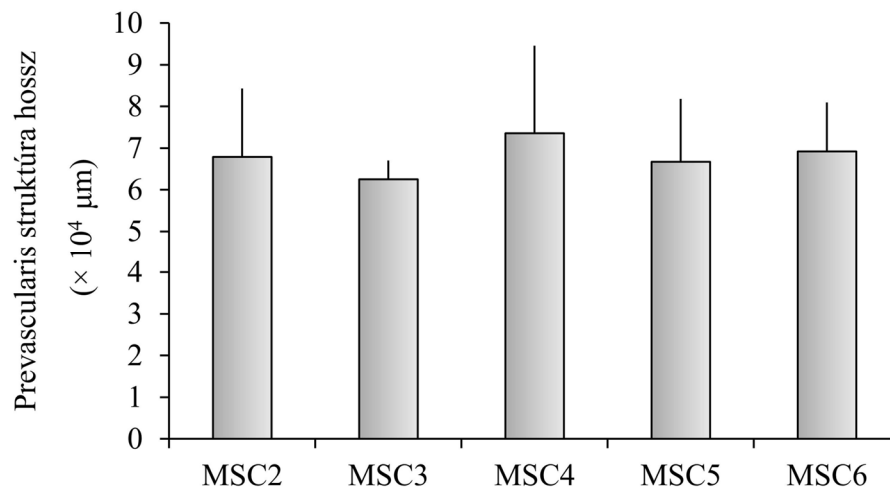
Ennek alapján az MSC klónokat H5V/MSC kokultúra rendszerben vizsgáltuk annak eldöntésére, hogy az MSC klonális szinten is rendelkezik-e proangiogén tulajdonsággal. Önmagában sem a H5V, sem az MSC klónok nem képeztek prevascularis struktúrákat. Kokultúra rendszerben viszont mindegyik MSC klón elősegítette a



prevascularis struktúrák kialakulását (11. ábra), és a képződő struktúrák hossza hasonló volt a különböző MSC klónt tartalmazó kokultúrákban (12. ábra).

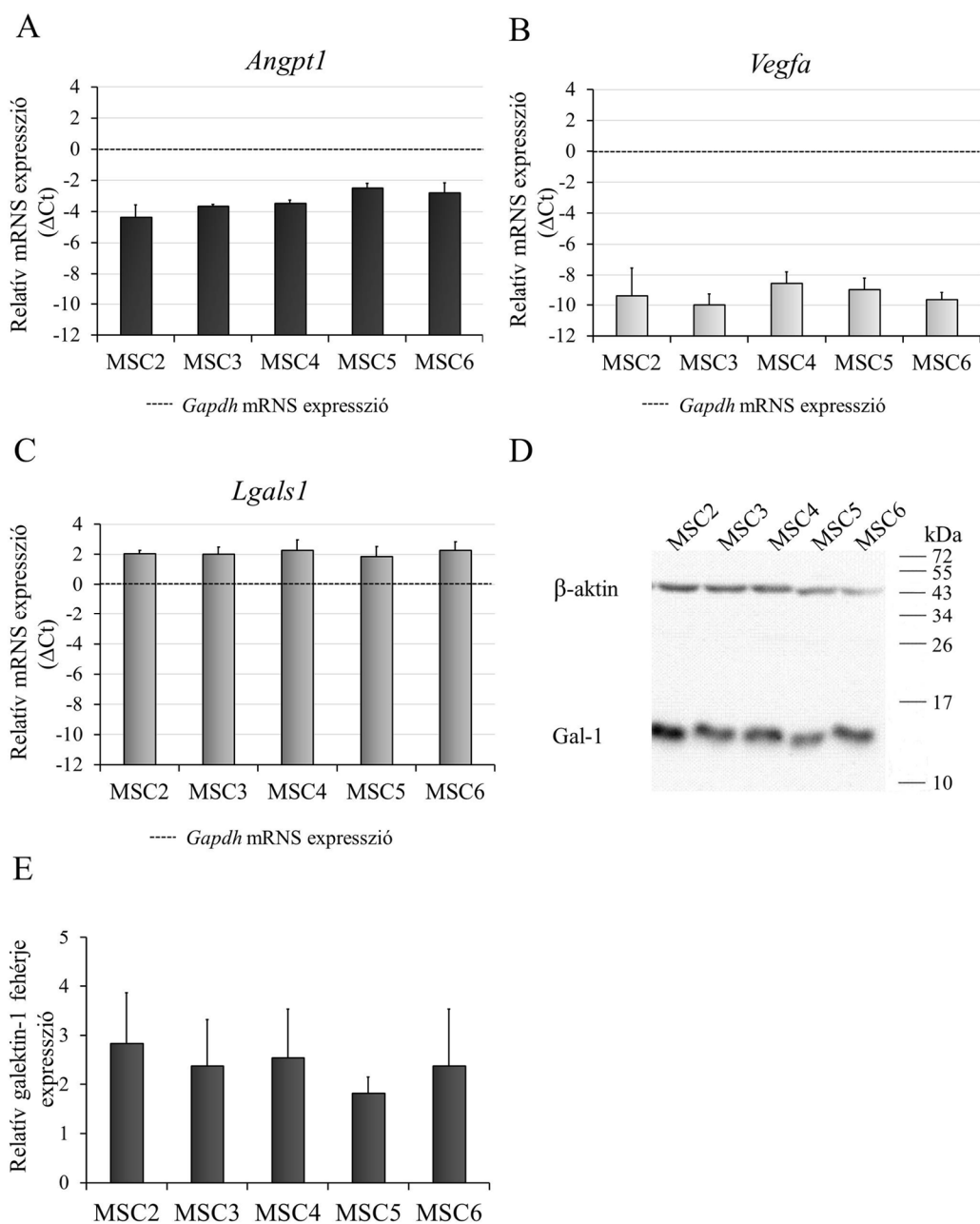


**11. ábra.** Az MSC klónok támogatják a prevascularis struktúrák képződését. A 3 napos kokultúrákban ( $2 \times 10^4$  MSC és  $2 \times 10^4$  H5V) képződő presvascularis struktúrákat 5 random módon kiválasztott nem átfedő látómezőben fényképeztük (lásd 10. ábra). Mércse =  $500 \mu M$



**12. ábra.** Az MSC klón/H5V kokultúrában képződő prevascularis struktúrák hossza hasonló. Az MSC/H5V kokultúra 3. napján készített 5 random módon kiválasztott, nem átfedő látómezőről készített fotón CellR imaging szoftver segítségével megmértük a struktúrák hosszát. Az ábrán a 3 független kísérletben mért összstruktúrahossz átlagát jelenítettük meg (+SD).

Az MSC klónok proangiogén faktorokat kódoló génjeinek kifejeződését qRT-PCR-rel vizsgáltuk és megállapítottuk, hogy az egyes gének expresszióját összevetve a klónokban az *Angpt1*, *Vegfa* és *Lgals1* gének mRNS kifejeződése hasonló volt (13/A-C. ábra). Az utóbbi faktor, a Gal-1 expresszióját fehérje szinten is analizáltuk. A 13/D és E ábra mutatja, hogy az egyes klónokban a Gal-1 szint hasonló.



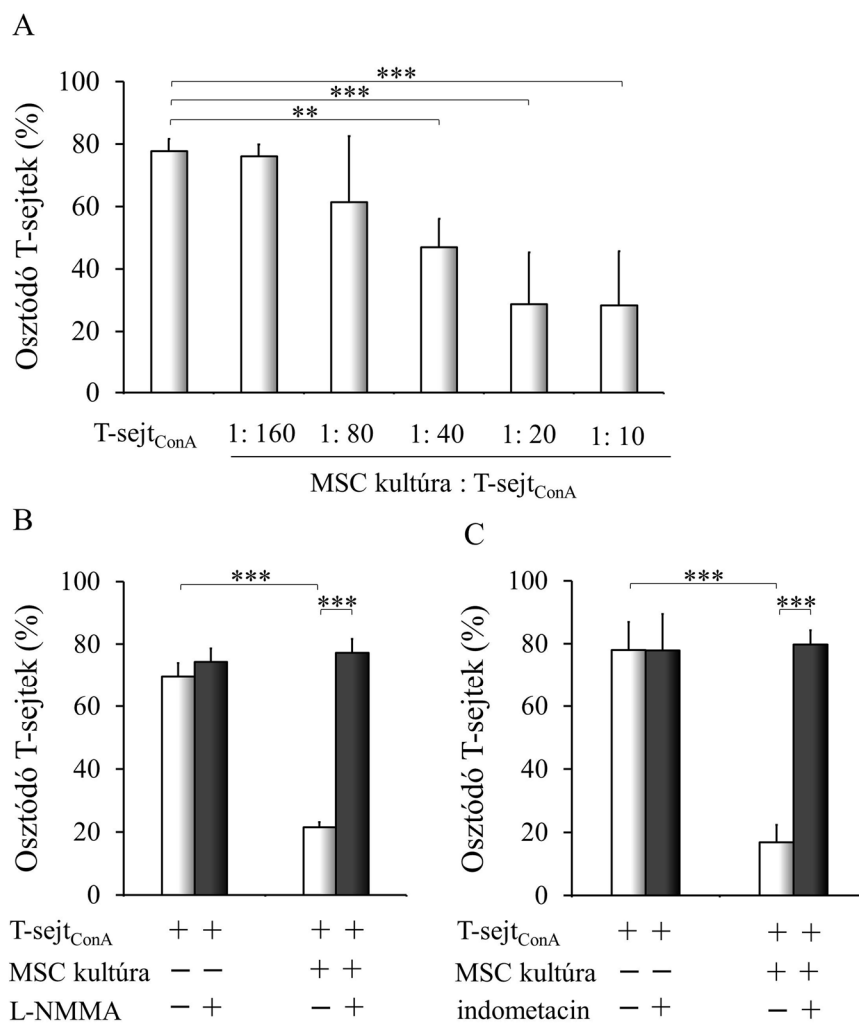
**13. ábra.** A vizsgált proangiogén faktorokat kódoló gének expressziója hasonló az egyes MSC klónokban. A.)-C.) A vizsgált gének expresszióját qRT-PCR segítségével vizsgáltuk. Az egyes gének kifejeződését (GOI) a *Gapdh* gén kifejeződéséhez viszonyítottuk a következő módon:  $\Delta Ct = Ct_{Gapdh} - Ct_{GOI}$ . A.) *Angpt1*, B.) *Vegfa*, C.) *Lgals1*. A  $\Delta Ct$  értékek 3 független kísérlet átlagai (+SD). D.) *Gal-1* fehérje expresszióját Western blottal analizáltuk. A reakció során a *Gal-1*-et nyúl anti-*Gal-1* és HRP-konjugált anti-nyúl ellenanyaggal jelöltük, és Amersham™ ECL Prime reagenssel előhívtuk. E.) A *Gal-1* mennyiségek összehasonlítását a Western blot denzitometráálásával végeztük. A felvételen a detektált sávok denzitását VisionWorks® LS Image Acquisition and Analysis szoftverrel analizáltuk. A grafikonon 2 független kísérlet eredményének az átlaga (+SD) szerepel.

## **V. 2. Immunszuppresszív aktivitás és immunszuppresszív faktorok; T-sejt osztódás gátlása *in vitro***

### V.2.a. Az MSC-k *in vitro* T-sejt osztódást gátló hatása

A klónozatlan, heterogén MSC kultúra hatását a ConA-val aktivált T-sejtek osztódására T-sejt/MSC kokultúrás rendszerben vizsgáltuk eltérő MSC-T-sejt arányoknál (1 : 160; 1 : 80; 1 : 40; 1 : 20 és 1 : 10). Az MSC-k 1 : 160 és 1 : 80 MSC/T-sejt arányban nem szignifikánsan, míg 1 :40, 1 : 20 és 1 :10 arányban szignifikánsan gátolták a T-sejtek proliferációját (14/A. ábra).

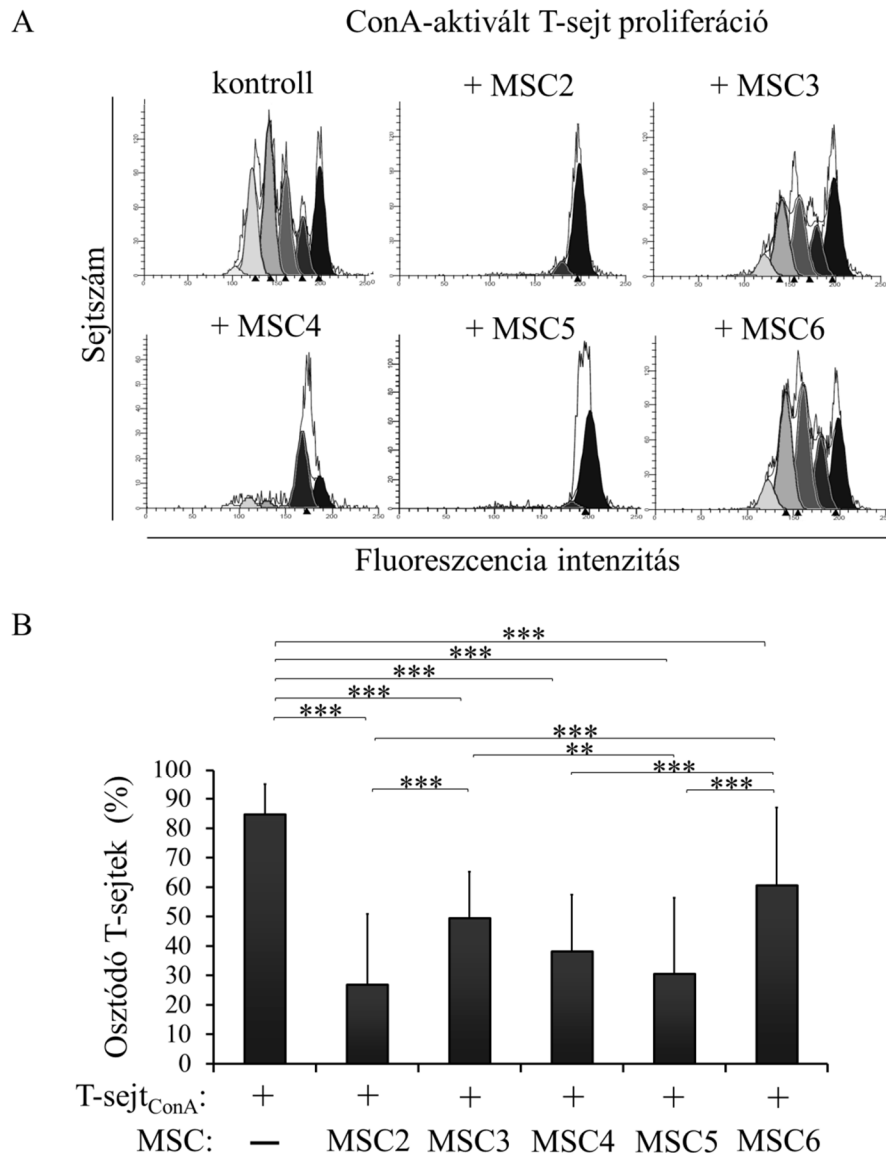
Az egér MSC immunszuppresszív hatásában a szakirodalom szerint a legjelentősebb faktorok az NO és a PGE2 (91,114,115). Az NO és a PGE2 szerepét az MSC általi T-sejt osztódás gátlásában specifikus inhibitorokkal vizsgáltuk. Az NO, illetve a PGE2 gátlószerét, az L-NMMA-t, illetve indometacint az MSC-T-sejt kokultúrához adtuk. Mindkét gátlószer teljesen megszüntette a klónozatlan MSC kultúra gátló hatását a ConA-aktivált T-sejtek osztódására (14/B. és C. ábra).



**14. ábra.** Az MSC kultúra T-sejt proliferáció gátló hatása és az NO, illetve a PGE2 szerepe ebben a folyamatban. A.) A CFSE-vel jelölt nyirokcsomó sejteket és az MSC-eket 1 : 160-1 : 10 arányban kokultúrába helyeztük. A T-sejtek proliferációját ConA-val stimuláltuk, és a kokultúra 3. napján a T-sejt proliferációt áramlási citométerrel mértük. B.) és C.) CFSE-vel jelölt nyirokcsomó sejteket MSC-vel 1 : 40 arányban tartottunk kokultúrában 50  $\mu$ M L-NMMA (B), vagy 10  $\mu$ M indometacin (C) jelenlétében, illetve inhibitorok nélkül. A T-sejt osztódást a kokultúra 3. napján áramlási citométerrel vizsgáltuk. A citofluorimetriás adatokat ModFit LT<sup>TM</sup> szoftver segítségével értékeltük ki. Az A.) és C.) ábrák 2-2 független kísérlet eredményének az átlagát (+SD). jelenítik meg, a B.) kísérlet pedig 3 független, triplikátumokkal végzett kísérlet közül a reprezentatívát jeleníti meg.

Az MSC klónok *in vitro* immunszuppresszív képességének vizsgálatára is az MSC-T-sejt kokultúrák rendszert alkalmaztuk. Az MSC klónok közötti különbségek előzetes kísérletek alapján az 1 : 40 arányú MSC-T-sejt kokultúrában jelentek meg, így a további kísérletekhez ezt az arányt választottuk. Mindegyik MSC klón szignifikánsan ( $p < 0,001$ )

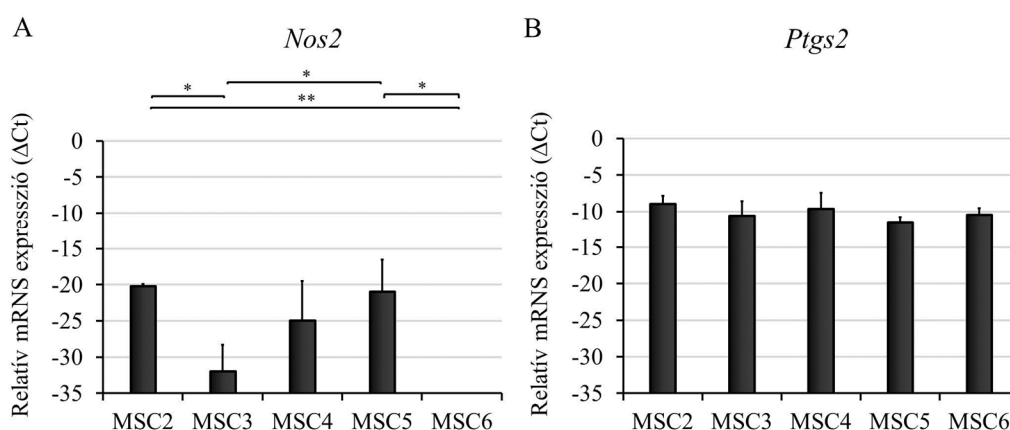
gátolta a ConA-aktivált T-sejtek proliferációját, ugyanis az MSC klónok jelenlétében az osztódó T-sejtek aránya az MSC nélküli kontrollhoz képest alacsonyabb volt (15/B. ábra). Az MSC2, MSC4 és MSC5 klón erőteljesen gátolta a ConA-aktivált T-sejtek proliferációját, míg az MSC3 és MSC6 gyenge gátló hatást fejtett ki (15/A-B. ábra). Az MSC klónok között gátlóképesség alapján a következő sorrendet állíthatjuk fel: MSC2  $\geq$  MSC5 > MSC4 > MSC3  $\gg$  MSC6.



**15. ábra.** Az MSC klónok gátlása a ConA-aktivált T-sejtek proliferációjára. A kokultúrás kísérlet a 14. ábrán leírtak szerint történt. Az A.) ábrán az MSC2-6-T-sejt kokultúrák reprezentatív citofluorimetriás profilja látható. A citofluorimetriás adatokat ModFit LT<sup>TM</sup> szoftver segítségével értékeltük ki. A B.) ábra 5 független, triplikátumokkal elvégzett kísérlet eredményét mutatja.

### V.2.b. Az immunszuppresszív faktorok génkifejeződése az MSC klónokban

Annak eldöntésére, hogy az MSC klónok közötti különbség a T-sejt proliferáció gátlásában abból adódik, hogy a klónok immunmoduláló génjeinek kifejeződése eltérő, qRT-PCR-rel megállapítottuk az NO és a PGE2 szintézisért felelős *Nos2*, *Ptgs2*, illetve a triptofán hiányos környezetet kialakító enzimet kódoló gén, az *Ido1* relatív mRNS szintjét. A *Nos2* alap állapotú kifejeződése tükrözte az MSC klónok T-sejt proliferáció gátló képességét. Az MSC2 és MSC5 klónok esetén mintegy 3 nagyságrenddel (a relatív mRNS különbség: 3338, illetve 1991), az MSC4 klónban pedig 2 nagyságrenddel (a relatív mRNS különbség 127) magasabban fejeződött ki a *Nos2*, mint az MSC3-ban. Az MSC6-ban a *Nos2* mRNS expresszió egyáltalán nem volt detektálható (16/A. ábra).



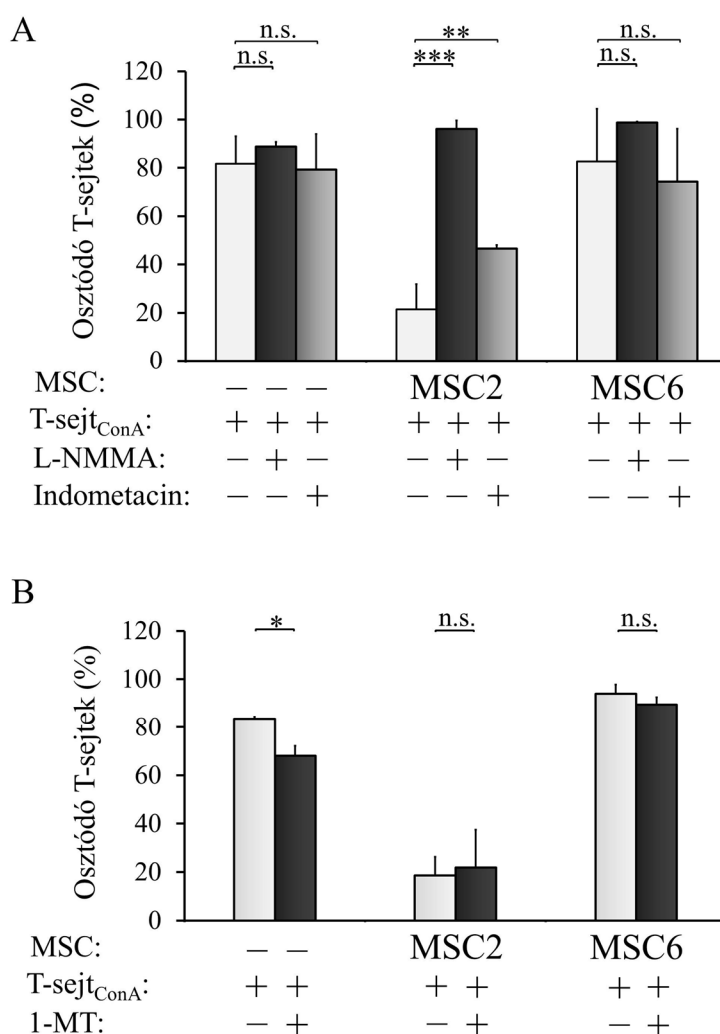
**16. ábra.** Az MSC klónok immunszuppresszív faktorait kódoló gének kifejeződése. Az MSC-k kiültetését követően 24 óra múlva RNS-t izoláltunk. A *Nos2* (A) és *Ptgs2* (B) gének kifejeződését qRT-PCR során a *Gapdh* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítottuk. Az ábrán 2 független kísérlet átlagát jelentettük meg (+SEM).

A *Ptgs2* alapállapotban minden klónban magasabban fejeződött ki, mint a *Nos2*, és a *Ptgs2* mRNS expresszióban nem volt szignifikáns különbség a klónok között (16/B. ábra). Az *Ido1* mRNS alapállapotban qRT-PCR-rel nem volt kimutatható egyik MSC klónban sem (21/C. ábra).

### V.2.c. Az *in vitro* T-sejt osztódás gátlásának hatásmechanizmusa

A hatásmechanizmus vizsgálatához a legerősebb és leggyengébb T-sejt proliferáció gátlást mutató MSC2 és MSC6 klónt választottuk. Az immunszuppresszív faktorok, az

NO, a PGE2 és az IDO1 szerepének tisztázására az MSC-T-sejt kokultúrákban specifikus inhibitorokat, L-NMMA-t, indometacint és 1-MT-t alkalmaztunk. Az L-NMMA teljesen, míg az indometacin részlegesen fordította vissza az MSC2 T-sejt proliferáció gátló hatását (17/A. ábra). Ezzel szemben a gátlószer jelenléte nem befolyásolta az MSC6 gátló hatását (17/A. ábra). Az 1-MT, nem megfelelő módon hatástalan volt a két MSC klón aktivitására (17/B. ábra), hiszen az IDO kifejeződése nem mutatható ki a klónokban (21/C. ábra).



**17. ábra.** Az NO, a PGE2 és az IDO1 szerepe az MSC2 és MSC6 klón T-sejt proliferáció gátló hatásában. A 14. ábrán leírtak szerint létesített kokultúrához 1 mM L-NMMA-t (A), 10 µM indometacint (A), illetve 1 mM 1-MT-t (B) adtunk vagy gátlószer nélkül inkubáltuk. A T-sejtek proliferációját áramlási citométerrel mértük 72 órás kokultúrában és az adatokat a ModFit LT<sup>TM</sup> szoftver segítségével értékeltük ki. Az A.) és B.) ábra egy triplikátumokkal végzett reprezentatív kísérlet eredményét mutatja.

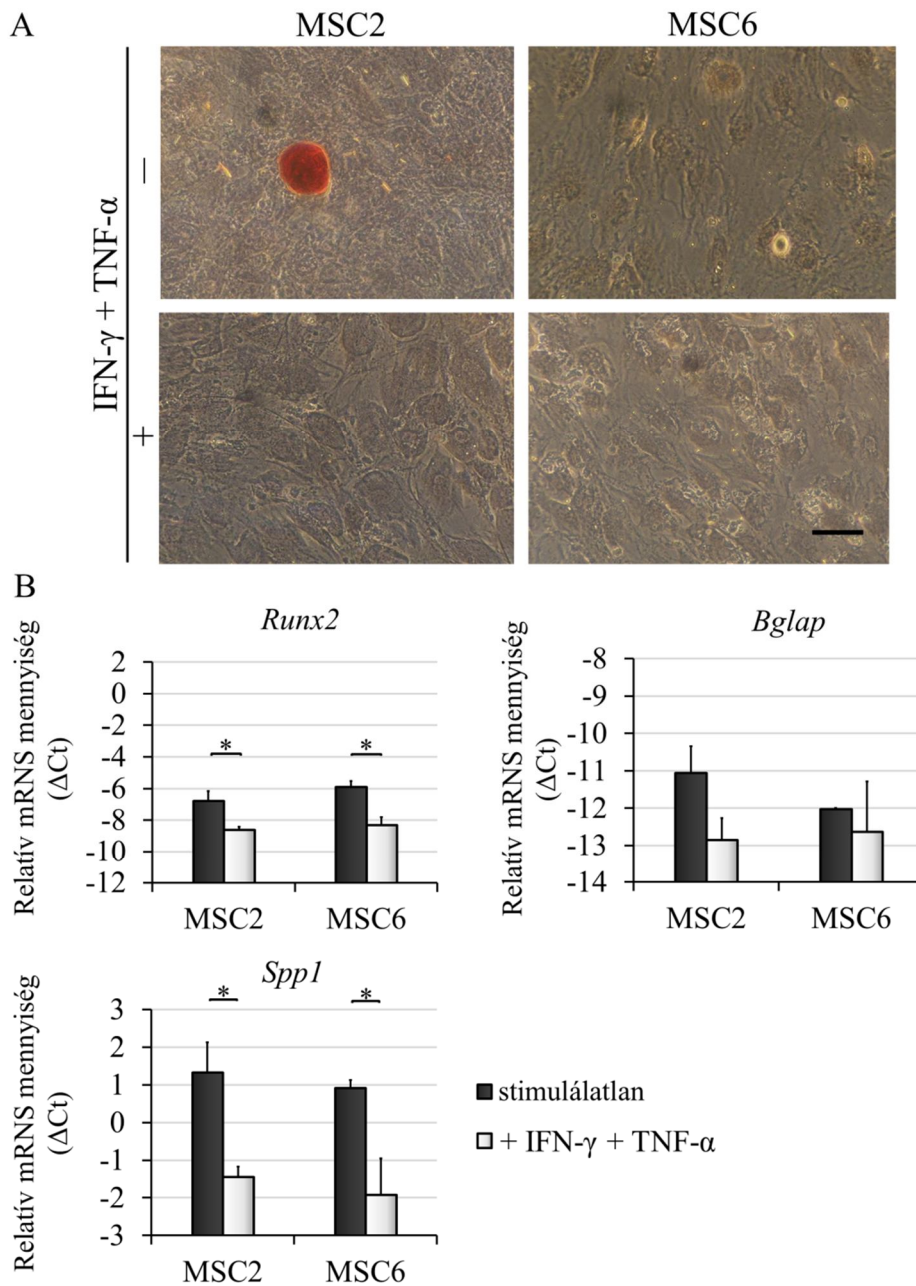


### **V.3. Gyulladásos faktorok hatása az MSC-k funkcióira**

#### V.3.a. Differenciáció

A gyulladásos környezet befolyásolja az MSC-k differenciálódását (129-134,136). Kérdésünk az volt, hogy vajon a különböző differenciálódási készséget mutató, egy sejtből kialakuló MSC klónok hasonló módon változnak-e gyulladásos mikrokörnyezetben. Az MSC2 és MSC6 klónokat IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val kezeltük és vizsgáltuk csont irányú differenciálódásukat. A citokinavatás megszüntette a stimulálás nélkül jól differenciálódó MSC2 klón csont irányú differenciációját, míg nem befolyásolta a stimulálás nélkül sem differenciálódó MSC6 klónt (18/A. ábra).

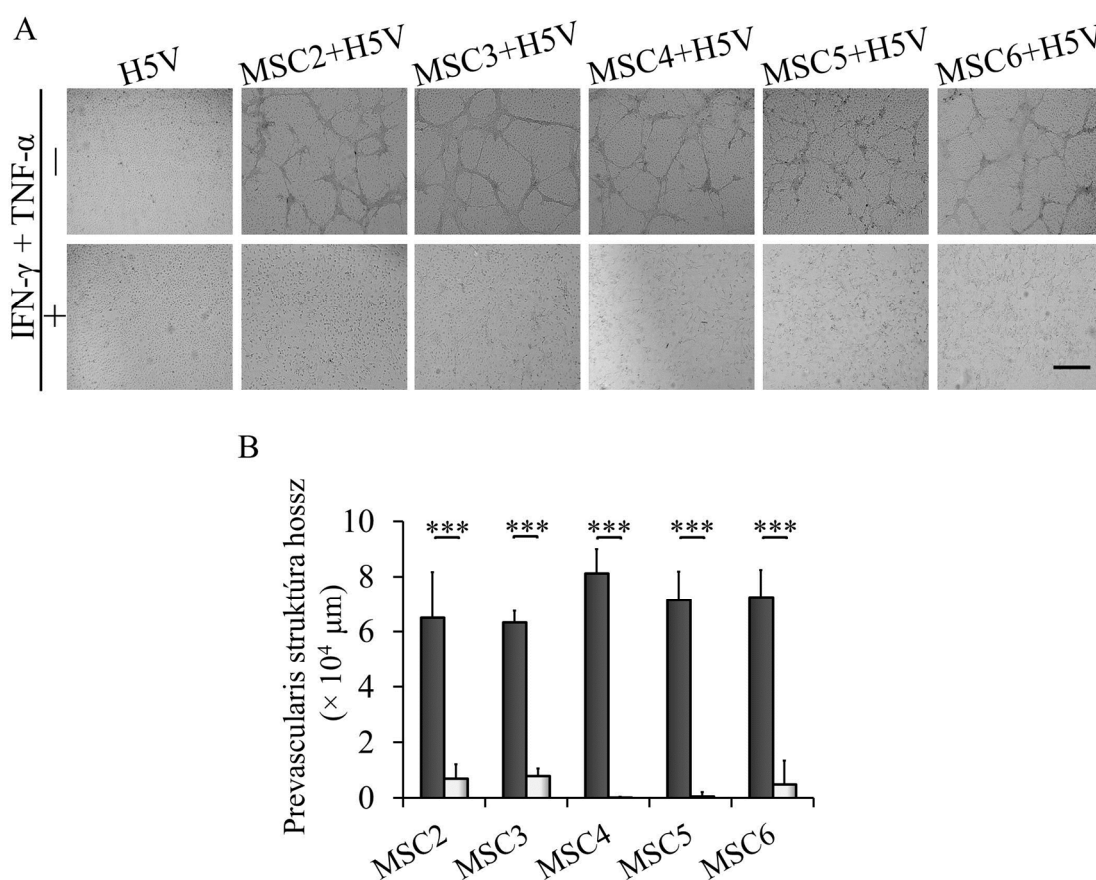
A fenti eredményekkel összhangban a 24 órás IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kezelés csökkentette az MSC2 és MSC6 klón csont irányú differenciálódását szabályozó és jelző markergének, a *Runx2*, *Bglap* és *Spp1* kifejeződését (18/B. ábra).



**18. ábra.** A citokinavatás hatása az MSC2 és MSC6 *in vitro* csontképző sejt irányú differenciálódására és a differenciációs markergének kifejeződésére. A.) A 100 ng/mL IFN- $\gamma$ -val és 50 ng/mL TNF- $\alpha$ -val előkezelt MSC2 és MSC6 kultúrákat 14 napra csont differenciáltató médiumba helyeztük. A csontosodási gócokban felhalmozódó kalcium festése Alisarin Red S-sel történt. A csontképző sejt differenciációról CKX41 mikroszkóphoz kapcsolt Olympus Camedia C-5060 kamerával készítettünk fényképeket. Mércse = 50  $\mu$ M. B.) A nem stimulált (fekete oszlopok) vagy citokinekkal stimulált (szürke oszlopok) MSC2 és MSC6 klónokból izolált RNS-ből qRT-PCR-rel vizsgáltuk a *Runx2*, *Bglap* és *Spp1* gének kifejeződését, melyeket a *Gapdh* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítottuk. A grafikon 2 független kísérlet eredményét (+SEM) jeleníti meg.

### V.3.b. Proangiogén hatás

A neoangiogenezis fontos lépése a szövetregenerációnak. A szövetek sérülése sok esetben a krónikus gyulladásoknak tudható be, ezért a gyulladással szemben ható MSC által támogatott érképzésre fontos szempontja volt a vizsgálatunknak. A 19. ábra mutatja, hogy a citokinek, IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  jelenlétében az MSC klónok H5V endotélsejtekkel együtt tenyésztve nem, vagy csak nagyon csekély mértékben képeztek prevascularis struktúrákat a citokin nélküli MSC-H5V kokultúrákhoz képest (19/A és B. ábra).

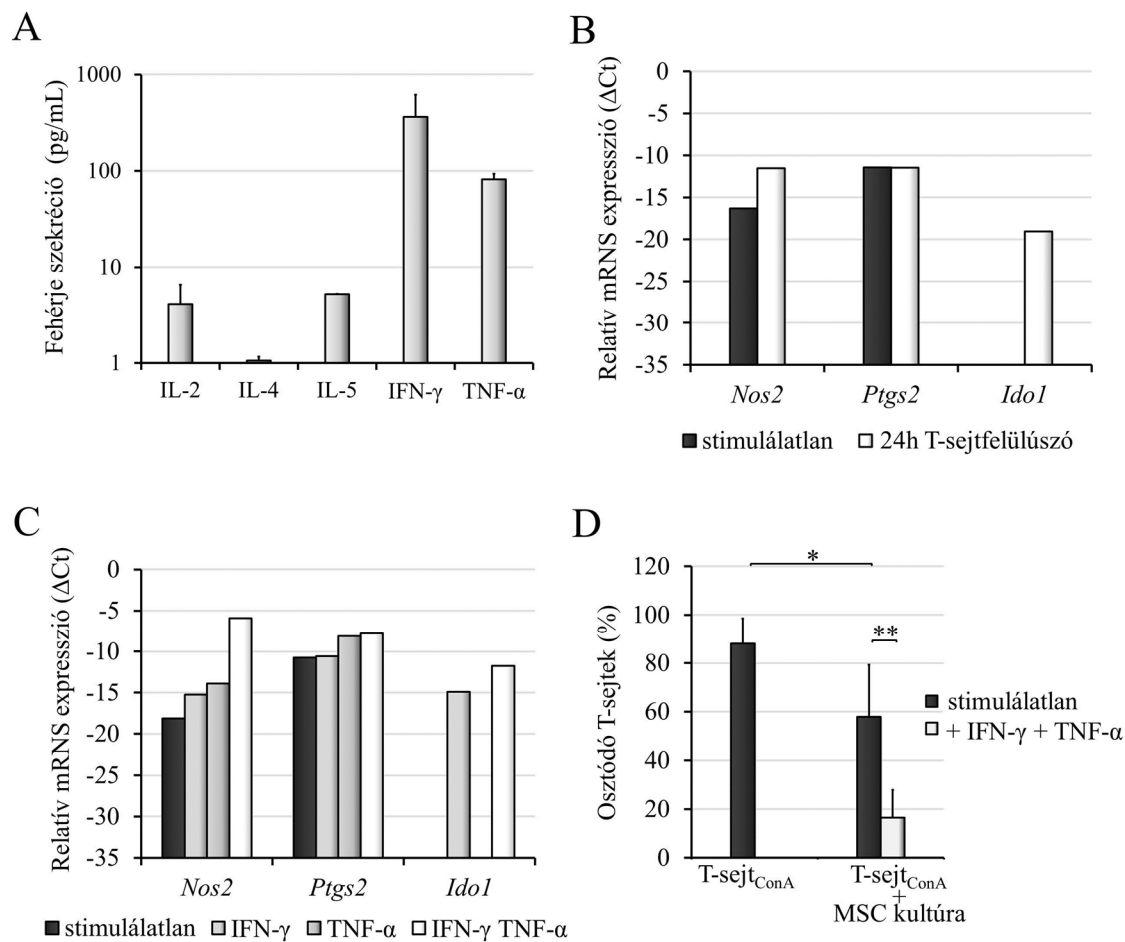


**19. ábra. Gyulladással szemben ható MSC-k proangiogén funkciójára.** A.) MSC-t ( $2 \times 10^4$  sejt) és H5V-t ( $2 \times 10^4$  sejt) 3 napig együtt-tenyésztettünk 24-lyukú lemezen 20 ng/mL IFN- $\gamma$  és 10 ng/mL TNF- $\alpha$  hozzáadásával vagy anélkül (kontroll). A kokultúrában képződő prevascularis struktúrákat 5 random módon kiválasztott nem átfedő látómezőben Olympus Cell-R fluoreszcens mikroszkóppal, 4x-es UplanSApo objektívvel fényképeztük. Az ábrán reprezentatív képek láthatóak. Mércse = 500  $\mu\text{M}$ . B.) CellR imaging szoftver segítségével mértük a struktúrák hosszát. Az ábrán az 5 látómezőben mért összesített struktúrahosszat jelenítettük meg, mely 3 független kísérlet eredményének az átlaga (+SD).

### V.3.c. T-sejt proliferáció gátlás *in vitro* modellrendszerben

Az MSC-k a sejttranszplantációk során sok esetben krónikus gyulladással környezetbe kerülnek, melyben a gyulladással citokinek koncentrációja magas. A következőkben azt vizsgáltuk, hogy a gyulladással mikrokörnyezet hogyan befolyásolja az MSC-k T-sejt osztódást gátló tulajdonságát. A krónikus gyulladás fenntartásában a Th1-sejtek és a makrofágok által termelt IFN- $\gamma$ -nak és TNF- $\alpha$ -nak van szerepe. A krónikus gyulladással mikrokörnyezet modellezésére T-sejteket aktiváltunk anti-CD3/CD28 ellenanyaggal. A T-sejt receptoron keresztül ilyen módon aktivált T-sejtek felülűszójában az IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$  mennyisége volt a legmagasabb (20/A. ábra). Ezt a felülűszót adtuk a klónozatlán, heterogén MSC kultúrához, és mértük az MSC-ben az immunmoduláló citokinek vagy az előállításukért felelős enzimeket kódoló gének (*Nos2*, *Ptgs2* és *Ido1*) expressziós változását. Az aktivált T-sejtek felülűszója magasabb szintre növelte a stimulálatlan MSC kultúrában alacsonyan kifejeződő *Nos2* mRNS szintjét (relatív mRNS változás: 27,66), indukálta az eddig nem kifejeződő *Ido1* expressziót, és a *Ptgs2* mRNS szintjében pedig nem okozott változást (20/B. ábra). A T-sejt felülűszóban aktiválás hatására nagy mennyiségben megjelenő IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  szerepét tisztított citokinekkel vizsgáltuk tovább. A *Nos2* mRNS kifejeződését a két citokin külön-külön is fokozta ( $2^{\Delta\Delta Ct_{IFN-\gamma}} = 7,36$ ;  $2^{\Delta\Delta Ct_{TNF-\alpha}} = 18,64$ ), ám a két citokin együtt sokkal erőteljesebben ( $2^{\Delta\Delta Ct_{IFN-\gamma/TNF-\alpha}} = 4705$ ) növelte az MSC kultúra *Nos2* mRNS kifejeződését (20/C. ábra). A *Ptgs2* mRNS kifejeződésére az IFN- $\gamma$  nem volt hatással ( $2^{\Delta\Delta Ct_{IFN-\gamma}} = 1,12$ ), a TNF- $\alpha$  viszont növelte ( $2^{\Delta\Delta Ct_{TNF-\alpha}} = 6,1$ ) (20/C. ábra). Az *Ido1* mRNS kifejeződést az IFN- $\gamma$  és a két citokin kombinációja jelentősen növelte, míg a TNF- $\alpha$  önmagában nem volt rá hatással (20/C. ábra). Ezeket az eredményeket figyelembe véve az MSC klónok kezelésére a két citokint együttesen használtuk.

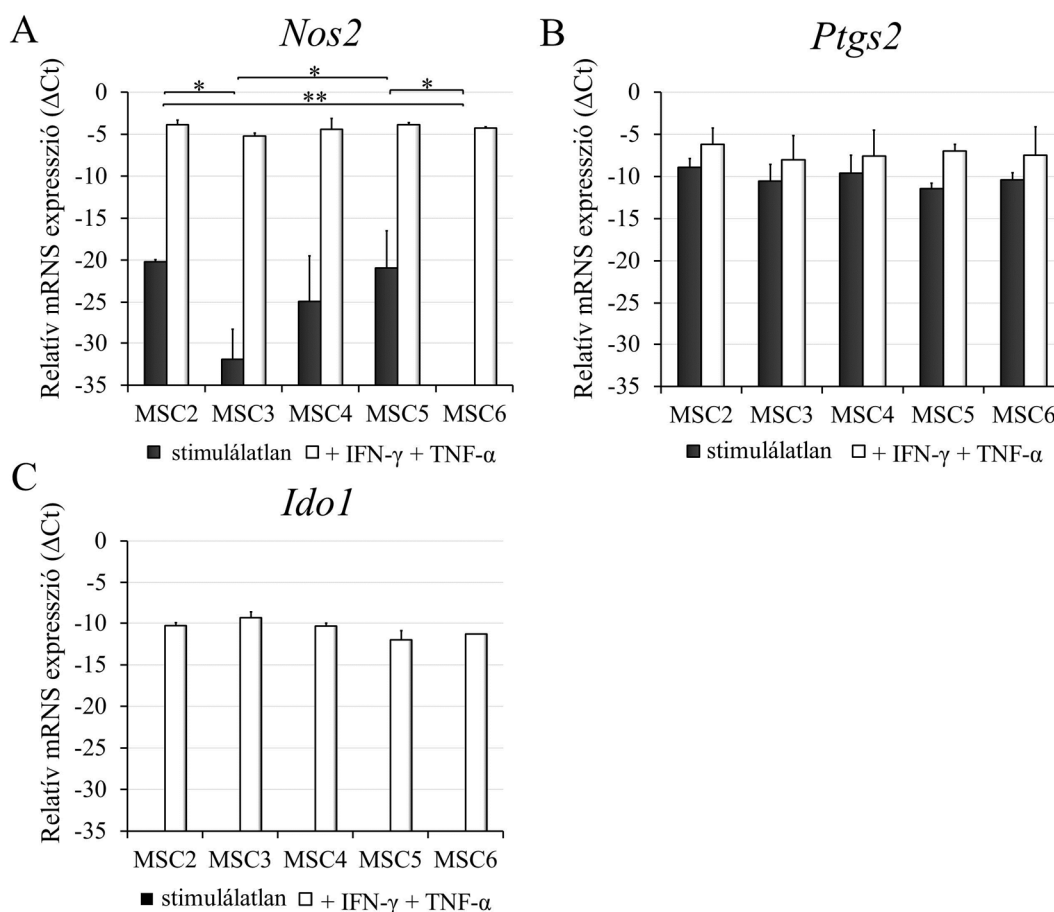
Annak vizsgálatára, hogy az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kezelés hatására megemelkedett *Nos2* mRNS szint befolyásolja-e a klónozatlán, heterogén MSC kultúra T-sejt proliferáció gátló képességét, az aktivált T-sejt proliferáció mértékét az IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val előkezelt MSC-k jelenlétében vizsgáltuk. A citokinnel előkezelt MSC kultúra szignifikánsan ( $p < 0,01$ ) jobban gátolta a ConA-aktivált T-sejtek osztódását (20/D. ábra).



**20. ábra. Gyulladásos citokinek hatása az MSC kultúra immunszuppresszív faktorainak termelődéséért felelős gének kifejeződésére és az MSC-k *in vitro* T-sejt proliferáció gátlására.** A.) Az izolált T-sejteket 72 órán át anti-CD3/CD28 ellenanyaggal aktiváltuk, majd mértük a sejtek által termelt IL-2, -4 -5, IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  mennyiségét Cytometric Bead Array és Mouse Th1/Th2 Cytokine kit segítségével. B.) Az MSC kultúrán a második napon a médium felét 72 órán át anti-CD3/CD28-cal aktivált T-sejtek felülűzőjára cseréltük, ezt követően 24 órával RNS-t izoláltunk, és qRT-PCR-rel mértük a jelölt gének kifejeződését. A génexpressziót a Gapdh háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítottuk. C.) Az MSC-eket nem kezeltük (sötét oszlopok) vagy 100 ng/mL IFN- $\gamma$ -val (szürke oszlopok), 50 ng/mL TNF- $\alpha$ -val (szürke oszlopok), vagy a két citokinnel együttesen 24 óráig kezeltük (világos oszlopok), majd RNS izolálás után qRT-PCR-rel mértük a jelölt gének expresszióját. D.) Az MSC-eket nem kezeltük (sötét oszlopok) vagy 100 ng/mL IFN- $\gamma$ -val és 50 ng/mL TNF- $\alpha$ -val együtt (világos oszlopok) 24 óráig stimuláltuk a kokultúrába helyezés előtt. A T-sejt osztódást az MSC/T-sejt kokultúrában a 13. ábrán leírtak szerint mértük. A D.) ábra 2 független, triplikátumokkal elvégzett kísérlet eredményét (+SD) mutatja.

Az MSC klónok gyulladásos citokinekkal (IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$ ) történő kezelése mindegyik klónban nagy mértékben megnövelte a Nos2 (relatív mRNA változás  $8 \times 10^4$  -

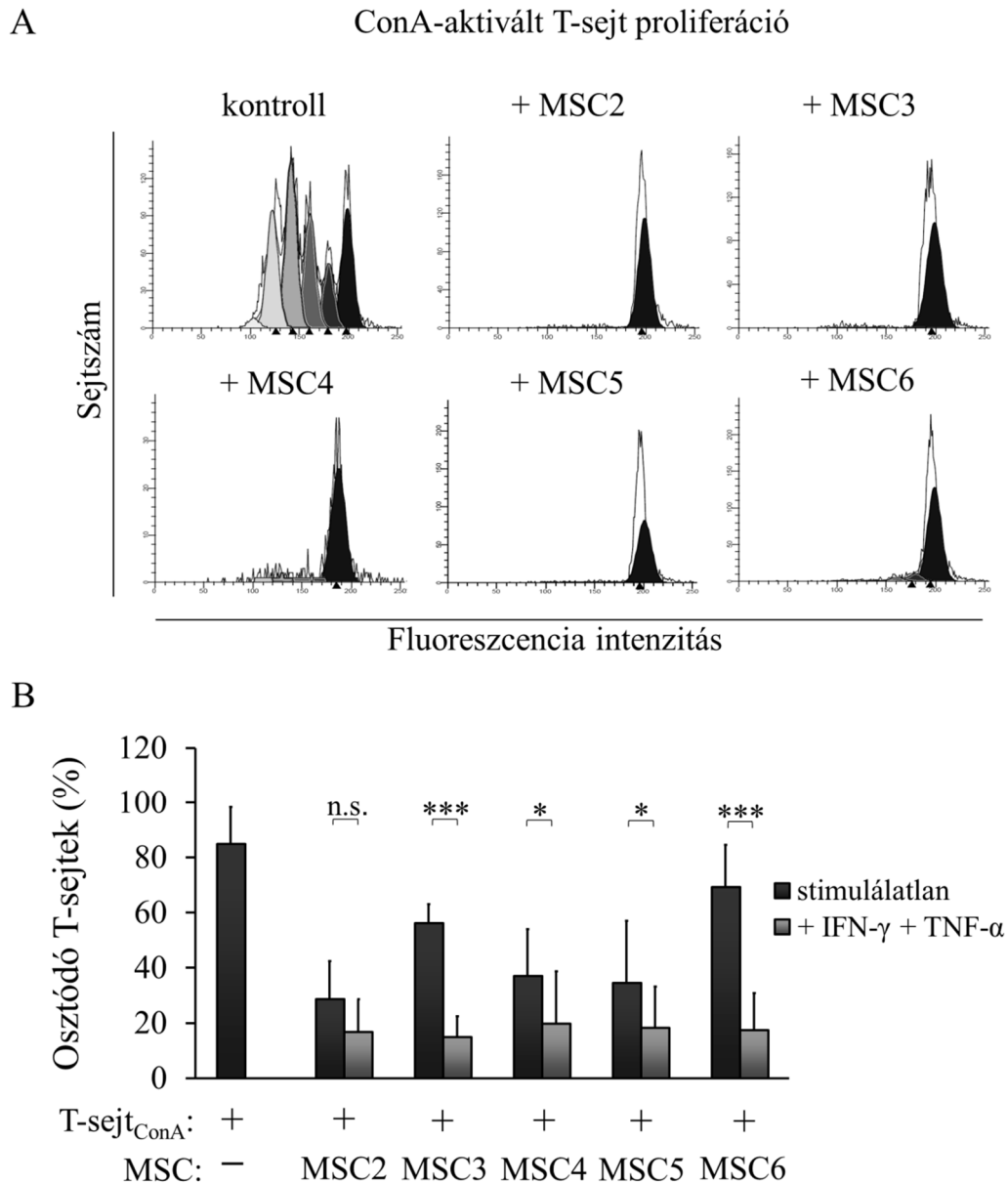
$1,08 \times 10^8$ ) (21/A. ábra) és *Ido1* (21/C. ábra) expresszióját, míg a *Ptgs2* (21/B. ábra) kifejeződésére kisebb hatással volt (átlagos mRNS változás 9,2). Az MSC3 és MSC6 klónban alacsonyan vagy nem kifejeződő *Nos2* mRNS (21/A. ábra) a citokinkezelés hatására a többi klónhoz hasonlóan magas szintre emelkedett (21/A. ábra) kiegyenlítve a stimulálatlan klónok között tapasztalt különbségeket.



**21. ábra. Gyulladáseltő citokinek hatása az MSC klónok immunszuppresszív faktorait kódoló gének kifejeződésére.** Az MSC-eket stimulálatlanul hagytuk (fekete oszlopok), vagy 24 óráig 100 ng/mL IFN-γ-val és 50 ng/mL TNF-α-val kezeltük (fehér oszlopok), majd a sejtekből RNS-t tisztítottunk. A *Nos2* (A), a *Ptgs2* (B) és az *Ido1* (C) gének kifejeződését qRT-PCR-rel vizsgáltuk. A vizsgált gén expressziójának mértékét a *Gapdh* háztartási gén kifejeződéséhez viszonyítottuk. Az ábrán 2 független kísérlet átlagát jelentettük meg (+SEM).

Az MSC klónok immunszuppresszív faktorainak expresszió növekedése (21. ábra) összhangban volt a T-sejt proliferáció gátló hatásukban bekövetkező változásokkal. A gyulladáseltő citokinekkel (IFN-γ és TNF-α) történő előkezelés fokozta az MSC klónok

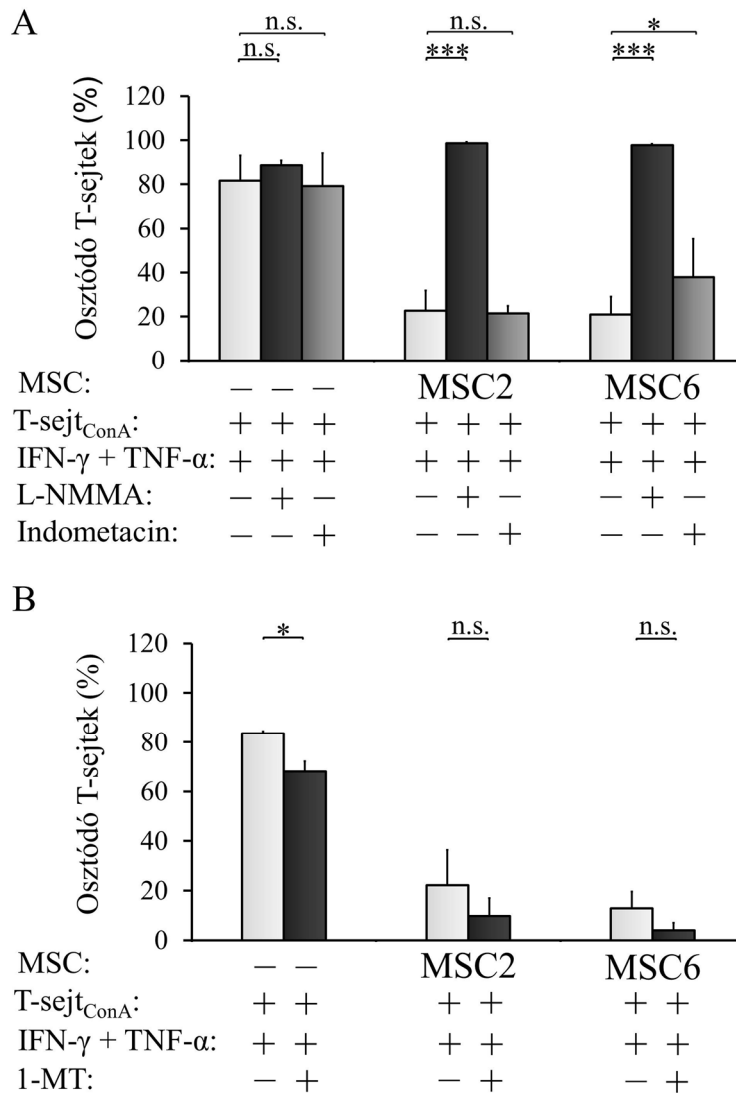
immunszuppresszív sajátosságát (22/A. ábra). A T-sejt osztódást gátló hatás fokozódása a gyengén gátló klónoknál, az MSC3-nál és MSC6-nál érvényesült legjobban, míg a stimulálatlanul is erősen gátló klónok hatása (MSC4 és MSC5) csekély mértékben erősödött, és a legerősebben gátló klón (MSC2) gátló hatása nem változott (22/B. ábra).



**22. ábra.** A IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kezelés különböző mértékben serkenti az MSC klónok T-sejtek proliferáció gátló hatását. A T-sejt proliferációs kokultúrás kísérlet a 14. ábra alatt leírtak szerint történt. A.) Az MSC-T-sejt kokultúrák reprezentatív citofluorimetriás profilja. B.) Az A.) ábrán bemutatott citofluorimetriás adatokat 5 független, triplikátumokkal végzett kísérlet esetében ModFit LT<sup>TM</sup> szoftver segítségével értékeltük ki.

Az előző kísérletek bizonyítják, hogy a gyulladásos citokinek jelenléte fokozza az MSC-k immunszuppresszív faktorainak expresszióját (21. ábra) és T-sejt proliferáció gátló hatását (22. ábra). A következőkben azt vizsgáltuk, hogy mely(ek) az(ok) az MSC-eredetű faktor(ok), melyek részt vesznek a T-sejt osztódás szabályozásában gyulladásos mikro környezetben. Specifikus inhibitorokkal gátoltuk az NO (L-NMMA) és a PGE2 (indometacin) szintézisét és az IDO (1-MT) aktivitását az IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val stimulált legerőteljesebb MSC2 és leggyengébb gátlást mutató MSC6 klónban. Az L-NMMA teljes mértékben megszüntette mindkét citokinekkal kezelt klón T-sejt proliferáció gátlását (23/A. ábra), mely igazolja, hogy az NO az MSC klónok fő faktora a T-sejt proliferáció gátlásban. Ezzel szemben a PTGS2-gátló indometacin csak részben csökkentette a citokinekkal kezelt MSC6 osztódásgátló hatását, a citokinekkal kezelt MSC2 esetében pedig hatástalan volt (23/A. ábra). Az IDO1 inhibitor 1-MT nem befolyásolta sem az MSC2, sem az MSC6 gátló hatását a T-sejtek osztódására (23/B. ábra) annak ellenére, hogy a gyulladáskeltő citokinkezelés erőteljesen indukálta az MSC klónokban az *Ido1* mRNS kifejeződését (21/C. ábra).



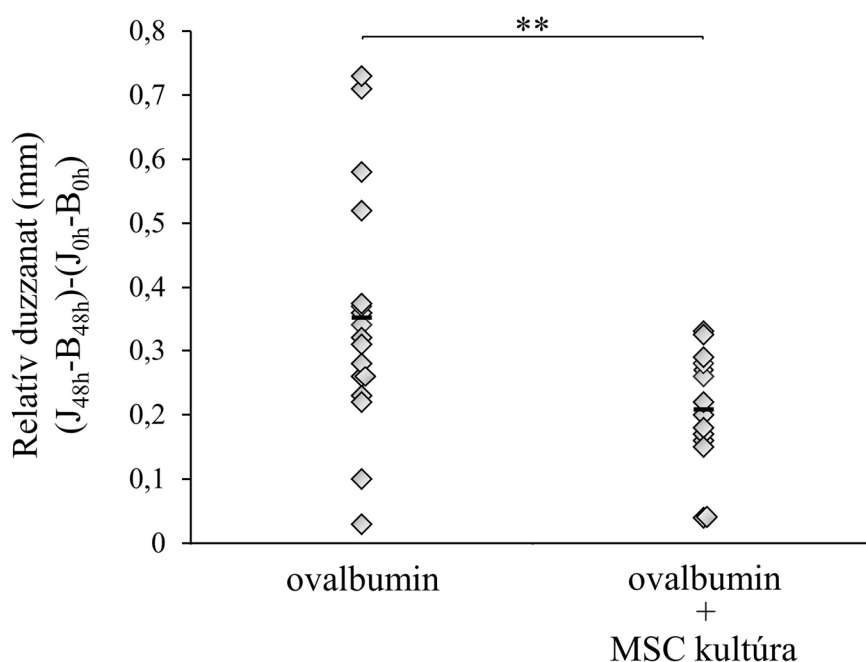


**23. ábra.** Az NO, a PGE2 és az IDO1 szerepe a gyulladáskeltő citokinekkal előkezelt MSC2 és MSC6 klón T-sejt proliferáció gátló hatásában. Az MSC-T-sejt kokultúrát a 14. ábránál leírt módon állítottuk össze A.) 1 mM L-NMMA, 10  $\mu$ M indometacin és B.) 1 mM 1-MT jelenlétében vagy gátlószer nélkül. A T-sejtek proliferációját áramlási citométerrel mértük 72 órás kokultúrában, és az adatokat a ModFit LT<sup>TM</sup> szoftver segítségével értékeltük ki. Az A.) és B.) ábra egy triplikátumokkal elvégzett reprezentatív kísérlet eredményét (+SD) mutatja.

#### V.4. *In vivo* DTH egérmódel alkalmazása az MSC-k és MSC klónok gyulladáscsökkentő hatásának igazolására

Az *in vivo* immunszuppresszív aktivitás vizsgálatához a csirke tojásfehérje, az ovalbumin által kiváltott késői típusú túlérzékenységi reakciót (DTH) választottuk. A kísérlet során ovalbumint oltottunk az egerek bőre alá és 4 nap után megismételve az oltást

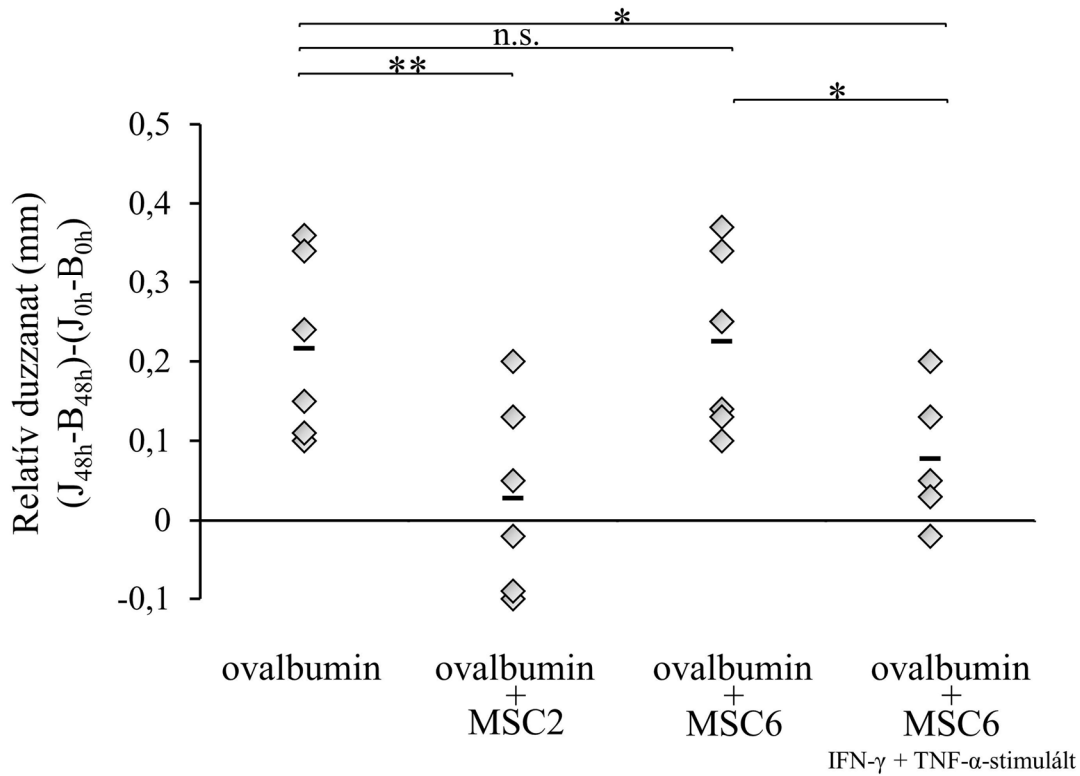
az egerek talppárnájába kiváltottuk a DTH reakciót, melyet a talppárnák erőteljes duzzanata jelzett. A reakció az újraoltást követő 2. napon a legmarkánsabb, így a talpak vastagodását ebben az időpontban tüntettük fel. Ha az első ovalbumin oltás időpontjában klónoztalan, heterogén MSC kultúrát oltottunk az egerek hasüregébe, akkor az MSC-k szignifikánsan ( $p = 0,0146$ ) csökkentették a talppárnák ödémáját a csak ovalbuminnal oltott kontrollhoz képest (24. ábra).



**24. ábra.** Az MSC kultúra immunszuppresszív hatása az ovalbumin indukálta késői típusú túlérzékenységi reakcióban. Hím C57BL/6 egerek bőre alá ovalbumint oltottunk, egyidejűleg a hasüregbe PBS-t vagy  $10^6$  MSC-t oltottunk. Négy nap múlva hőaggregált ovalbumint oltottunk az egerek jobb oldali hátsó talppárnájába (J) és PBS-t a bal oldali hátsó talppárnájába (B). Negyvennyolc óra után mértük az egerek talppárnájának vastagodását (mm). Az ábra 6 független kísérlet adatait tartalmazza ( $n = 17$ ;  $n = 14$ ).

Az MSC2 és MSC6 klónok *in vivo* immunszuppresszív aktivitását az ovalbumin által kiváltott DTH reakció gátlásában vizsgáltuk. Az MSC2-vel történő oltás szignifikánsan csökkentette az ovalbumin által kiváltott talppárna duzzanatot ( $p < 0,01$ ), míg az MSC6-tal történő oltás nem befolyásolta a talpödémát. Ha azonban az MSC6 klónt a beoltást megelőzően 24 óráig kezeltük IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val, az MSC6 az MSC2-höz

hasonlóan szignifikánsan ( $p < 0,05$ ) csillapította a talppárnák duzzanatát (25. ábra). Az erősen immunuszpresszív MSC2 hatása nem változott citokin előkezelés hatására (nem bemutatott adat).



**25. ábra.** Az MSC2 és MSC6 hatása az ovalbumin által kiváltott DTH reakcióra. Hím C57BL/6 egerek bőre alá ovalbumint oltottunk, egyidejűleg a hasüregbe PBS-t vagy  $10^6$  MSC2-t, MSC6-ot, illetve 24 óráig 100 ng/mL IFN- $\gamma$ -val és 50 ng/mL TNF- $\alpha$ -val előkezelt MSC6-ot oltottunk. Négy nap múlva hőaggregált ovalbumint oltottunk az egerek jobb oldali hátsó talppárnájába (J) és PBS-t a bal oldali hátsó talppárnájába (B). Negyvennyolc óra után mértük az egerek talppárnájának vastagodását (mm). Az ábra 2 független kísérlet adatait tartalmazza ( $n = 5-6$ ).

## VI. Következtetések

A mesenchymalis őssejteket ezidáig több száz különböző célú klinikai vizsgálatba vonták be, melyek kimenetele meglehetősen változatos képet mutatott (46). Egyik feltételezett tényező ennek hátterében az MSC-k heterogenitása (157). Több, egy sejt eredetű MSC klónnal végzett tanulmány kimutatta, hogy az MSC klónok mesenchymalis irányokba történő differenciálódási képessége eltérő (146). Más tulajdonságok, mint például a klónok proangiogén funkciója kevésbé került a heterogenitási vizsgálatok látómezejébe, továbbá az immunzuppresszív funkciót érintő heterogenitást illetően sincs egyetértés a területen, mivel az ilyen irányú vizsgálatok száma csekély és eredményeik ellentmondásosak. Míg Xu és kollégái szerint az MSC klónok immunmodulációs képessége hasonló (113), más csoportok jelentős eltérést mutattak ki a klónok ilyen funkciója között (115,153,154).

A jelen értekezés tárgya az egér csontvelői eredetű MSC populáció egysejtszintű diverzitásának vizsgálata, melyben elsősorban az MSC klónok nem gyulladós és gyulladós környezet által befolyásolt *in vitro* és *in vivo* immunzuppresszív tulajdonságára összpontosítottunk. Emellett a jellemzés részeként vizsgáltuk, hogy a gyulladós citokinek hogyan módosítják a klónok csontképző- és zsírsejt irányú differenciációját, valamint a proangiogén (érképző) hatását.

### VI.1. Az MSC-k differenciációja

Az MSC-k a szöveti regenerációt részben úgy segíthetik, ha közvetlenül a sérült szövet irányába differenciálódnak. Vajon egy MSC populáció egyes sejtjeiből kialakuló kolóniák hasonló, vagy különböző mértékben képesek differenciálódni? Az általunk vizsgált MSC klónok *in vitro* csont irányú differenciációja különböző volt, ami összhangban van az eddig közölt humán és rágcsáló MSC klónok csont differenciációját érintő eredményekkel (115,149,150,158). Zsírsejt irányba mindegyik MSC klón hasonlóan differenciálódott. A terápiás felhasználás során az MSC beépülésnek és szövetirányú differenciálódásnak sok esetben olyan szövetben kell megvalósulnia, mely erőteljes gyulladásban van. Így a differenciálódási képesség vizsgálata gyulladós mikrokörnyezetben alapvető fontosságú. A vizsgált MSC klónok gyulladós citokinekkal (IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$ ) történő előkezelés után nem differenciálódtak csont irányba, és a gyulladós citokinek csökkentették a csont differenciációt szabályozó és jelző gének

(*Runx2*, *Bglap*, *Spp1*) kifejeződését is. Ez az eredmény összhangban van azokkal a tanulmányokkal, melyek szerint a TNF- $\alpha$  gátolja az *in vitro* csont irányú differenciálódást (129-132), viszont ellentmond azoknak az eredményeknek, melyek szerint a TNF- $\alpha$  önmagában vagy IL-17-el kombinálva fokozza a csont irányú differenciációt (133,134). A fenti ellentmondásra magyarázatul szolgálhat, hogy a szerzők eltérő citokinkoncentrációt alkalmaztak. Az alacsony citokinkoncentráció ugyanis serkentő, míg a magas gátló hatású (131,135). *In vivo* állatmodellben, vad típusú egérben az IFN- $\gamma$ -t és TNF- $\alpha$ -t semlegesítő ellenanyagok fokozzák az MSC csont differenciációját (131), mely az általunk kapott eredményt támasztja alá.

## **VI.2. Az MSC-k proangiogén funkciója**

A sérült szövetek megújulásánál sok esetben szükség van új erek képződésére is. Az elmúlt években bebizonyosodott, hogy az MSC-k által termelt faktorok palettája rendkívül széles, melyek között találhatunk endotélsejtek növekedésére és érképző folyamataira ható molekulákat is (159). Ezáltal *in vitro* modellrendszerben az MSC-k előidéznek az endotélsejtek rendeződését kapilláris-szerű struktúrákba (23,65). Ezzel összhangban mi magunk is kimutattuk, hogy az MSC-k H5V endotélsejtekkel spontán módon, összefüggő prevascularis hálózatot alakítanak ki, melynek kiterjedtsége függ attól, hogy az MSC termel-e galektin-1 fehérjét (71). Kérdés, hogy az MSC sejtpopulációban az egyes sejtek hasonlóan vagy eltérően támogatják-e az angiogenezist az *in vitro* prevascularis modellben. A klónozás során nyert monoklonális MSC (MSC2-MSC6) sejtek hasonló mértékben képeznek prevascularis struktúrákat a H5V endotélsejtekkel, és ennek megfelelően a klónokban a proangiogén faktorok, *Vegfa*, *Angpt1* és *Lgals1* mRNS kifejeződése is hasonló. Az MSC-k terápiás alkalmazása folyamán a sérülés helyére jutó MSC proangiogén hatását módosíthatja a gyulladással járó mikrokörnyezet. Az általunk vizsgált klónok gyulladáskeltő citokinek (IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$ ) jelenlétében nem, vagy nagyon csekély számú prevascularis struktúrát képeztek endotélsejtekkel együtt tenyésztve. További vizsgálatok szükségesek annak megértésére, hogy a gyulladással járó citokinek hogyan befolyásolják az MSC-k érképződést serkentő faktortermelését. Egy tanulmány arról számol be, hogy az IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ -előkezelt MSC-kben megnő a VEGF és hipoxia indukálta faktor-1 $\alpha$  szekréciója, mely hozzájárulhat ahhoz, hogy a citokinekkel előkezelt MSC-k jobban elősegítik a tumornövekedést és -éreképződést (137).

Eredményeinkből az látszik, hogy a gyulladásoz környezet gátolja az MSC-k differenciálódási és proangiogén hatását. Ezek alapján felmerül a kérdés, hogy azoknál a terápiáknál, melyeknél feltételezzük, hogy az MSC differenciációja vagy proangiogén hatása fontos szereppel bír, javasolt lehet-e a gyulladás csökkentése az MSC transzplantációt megelőzően? Véleményünk szerint fontos lenne ennek a kérdésnek a megválaszolása állatkísérletes betegségmodellek segítségével.

### **VI.3. Az MSC-k immunszuppresszív funkciója**

A Ph.D. dolgozatomban leírt munkának a fő irányvonala az MSC immunmoduláló képességének egysejtszintű (klonális) vizsgálata. Az izolált MSC klónok különböző mértékben gátolták a ConA-aktivált T-sejtek osztódását, ahol a gátlás mértéke 30%-tól 70%-ig terjedt. Az MSC2, MSC4 és MSC5 klónok nagy mértékig gátolták a T-sejtek proliferációját, míg az MSC3 és MSC6 klónok általi gátlás szignifikánsan gyengébb volt. Ez az eredmény illeszkedik a mások által publikált adatok sorába (115,153,154), melyek az egy sejt eredetű MSC klónok immunszuppresszív képességének különbségeiről adnak számot. A T-sejt proliferáció gátlásában megfigyelt sokféleség a *Nos2* immunmodulációs gén klónonként változó szintű kifejeződésével magyarázható. A *Nos2* által kódolt enzim funkciója a NO előállítása. Az erős gátlást mutató MSC2 és MSC5 klónok esetén mintegy 3 nagyságrenddel (a relatív mRNS különbség: 3338, illetve 1991), az MSC4 klónban pedig 2 nagyságrenddel (a relatív mRNS különbség 127) magasabban fejeződött ki a *Nos2*, mint a csekély gátlást mutató MSC3-ban. A *Nos2* expresszió nem volt detektálható a legkevésbé gátló MSC6-ban. A klónokban mért különböző *Nos2* mRNS expresszió háttérében sok tényező állhat. Egyrészt a *Nos2* gén átírását számos aktiváló és gátló hatású transzkripciós faktor szabályozza, melyek eltérő működése az egyes MSC klónokban különböző *Nos2* transzkripcióhoz vezethet (160). A különbség a *Nos2* mRNS molekula poszttranszkripcionális szabályozásából is fakadhat, az mRNS stabilitást szabályozó faktorok mint a heterogén nukleáris ribonukleoprotein I és L (hnRNPI/L) komplex eltérő kötődésével is magyarázható lehet (161). A NO T-sejt proliferáció gátlásban betöltött központi szerepét a NOS2 gátlószer, az L-NMMA használatával megerősítettük, mely visszafordította a legkifejezettebben gátló MSC2 klón hatását. Ennek a kísérletnek az eredménye egyezik a mások által, a teljes MSC populációval kapcsolatban leírtakkal (114,115,153). A PGE2 szintézisben részt vevő enzimet kódoló *Ptgs2* gén kifejeződésében nem találtunk szignifikáns különbséget a klónok között. Az egér MSC

immunszuppressziójának mechanizmusában a PGE2 szerepét ellentmondó adatok övezik, melyek értelmében a PGE2-nek fontos (91) vagy mellékes (114) szerep jut, míg mások szerint egyáltalán nem járul hozzá a folyamathoz (113,115,153). A PTGS2 gátlószer, az indometacin a mi kísérleteink szerint részben gátolta a T-sejt proliferációt, ezzel alátámasztva a PGE2 bizonyos fokú szerepét.

Egyre nő azoknak az irodalmi adatoknak a száma, melyek azt támasztják alá, hogy az MSC-ket övező gyulladós mikrokörnyezet erőteljesen befolyásolja az MSC-k biológiai funkcióját. A gyulladás helyén az immunsejtek által termelt gyulladós citokinek (115,127) általi aktivációt idegen szóval „licensing”-nek nevezzük (128), mely a dolgozatban az általunk alkotott citokinavatás kifejezésként szerepel. A citokinavatás az MSC-ket gyulladáscsökkentő fenotípus irányába tolja el, mely függ a felhasznált faktor típusától, koncentrációjától és a kezelés időtartamától (128). A gyulladós környezet modellezésére és ezáltal az MSC-k gátló hatásának serkentésére az IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$  citokinek kombinációját választottuk. Az MSC kultúra előkezelése IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val együttesen számottevően megemelte a *Nos2* ( $2^{\Delta\Delta\text{CtIFN-}\gamma\text{TNF-}\alpha} = 4705$ ), illetve indukálta az *Ido1* gén kifejeződését, és a citokinavatás kis mértékben növelte a *Ptgs2* gén kifejeződését ( $2^{\Delta\Delta\text{CtIFN-}\gamma\text{TNF-}\alpha} = 7,62$ ) is. Következésképpen a citokinavatott MSC kultúra T-sejt proliferáció gátló képessége szignifikánsan megnőtt a kezeletlen MSC-éhez képest. Az MSC klónok IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kezelése is serkentő hatású volt, és ilyen módon kiegyenlítette a klónok közti különbségeket, melyek a T-sejt osztódás gátlásában mutatkoztak, így a gyengén gátló MSC3 és MSC6 klónok elérték a kiemelkedően gátló MSC2, MSC4 és MSC5 klónok szintjét T-sejt osztódás gátlást illetően. Ez az eredmény arra mutat rá, hogy az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kezelés stimulálja a funkcióképtelen MSC klónok immunválaszt gátló képességét. Az MSC kultúránál megfigyeltekhez hasonló módon a citokinavatás az MSC klónokban is markánsan növelte a *Nos2* és az *Ido1* és közepesen fokozta a *Ptgs2* gén kifejeződését. Az a megfigyelésünk, hogy a citokinavatás minden klónban egyöntetűen indukálja a *Nos2* mRNS expressziót, arra enged következtetni, hogy a stimulálatlan klónok közötti *Nos2* mRNS expressziós különbségek nem a *Nos2* génben történő mutációból fakadnak.

A citokinek által erőteljesen indukált *Nos2* valóban szerepet játszik az MSC klónok által T-sejtekre kifejtett osztódásgátlásban, ugyanis specifikus gátlószerével, az L-NMMA-val a citokinavatott MSC2 és MSC6 működése gátolható volt. A PTGS2 indometacinnal történő gátlása részben megszüntette az MSC6 immunszuppresszív képességét, az MSC2-

ére azonban a gátlószer hatástalannak bizonyult. Ebből azt a következtetést vonhattuk le, hogy az MSC populáción belül nem egységes az immunszuppressziót szolgáló különböző faktorok, mint a PTGS2 szerepe.

Az *Idol* mRNS kifejeződésének indukciója volt a legszembetűnőbb változás, amelyet a gyulladáshoz vezető körülmények közt tapasztaltunk, hiszen a stimulálatlan MSC kultúra és az MSC klónok ezt a gént egyáltalán nem fejezték ki. Ugyanakkor az IFN- $\gamma$  és az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kombinációja indukálta az *Idol* mRNS kifejeződését az MSC kultúrában, illetve a klónokban. A magas *Idol* expresszió ellenére az IDO1 specifikus gátlószer, az 1-MT nem volt hatással a citokinaktivált MSC klónok immunszuppresszív képességére. Jóllehet a humán MSC egyik legfontosabb immunmoduláló faktora az IDO1 (99,110), egér MSC-ben a szerepe nem egyértelmű. Még ha a gyulladáshoz vezető citokinek előidézték is az *Idol* mRNS kifejeződését, az IDO1 fehérje egér MSC-ben nem volt kimutatható (125). Ennek megfelelően az IDO1 termelés gátlása nem oldotta fel az egér MSC T-sejt osztódás gátló hatását (99,114,115). Erre talán magyarázatot nyújthat az a megfigyelés, hogy egy epitéliás karcinóma sejtvonalban az NO felszabadulása előidézte az IDO1 gyors proteaszómás lebomlását (162). Elképzelhető, hogy az IDO1 az NO hatására az egér MSC-ben is lebontásra kerül, ennek igazolására azonban további kísérletek szükségesek.

Az MSC-k *in vitro* T-sejt proliferációt gátló és így immunszuppresszív hatását az *in vivo* állatmodellek is alátámasztják (72,95,118,142,143), mely felveti annak a lehetőségét, hogy az MSC sejterápia alkalmas lehet különböző immunológiai kórképek kezelésére. Az MSC-k *in vivo* immunmoduláló hatását mi is igazoltuk egy ovalbumin által kiváltott késői típusú túlérzékenységi reakcióban. Az MSC kultúra eredményesen csökkentette az egerek ovalbumin oltás által előidézett talppárna duzzanatát. Ugyanebben az *in vivo* rendszerben azt is kimutattuk, hogy az *in vitro* T-sejt osztódást a legerősebben és legkevésbé gátló MSC2, illetve MSC6 klón sikeresen (MSC2), illetve gyengén (MSC6) gátolta a DTH reakciót. Az *in vitro* eredményeket igazolta az is, hogy IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val előkezelt MSC6 az MSC2-klónhoz hasonlóan csillapította a talpak ödémáját jelezvén, hogy a gyenge hatású stimulálatlan MSC6 klón immunszuppresszív képessége a citokinaktiválás révén megnőtt. Eredményeink alátámasztják azokat a GVHD egérmodelljével végzett kísérleteket, melyekben a betegség kialakulásának megelőzésében az IFN- $\gamma$ -val előaktivált MSC oltása hatásosabbnak bizonyult, mint a kezeletlen MSC-vel való oltás (143).



### VI.3. Összefoglalás

Munkánk összegzéseként megállapíthatjuk, hogy az egér csontvelői MSC populáción belül az immunmoduláló képességet illetően sokféleség uralkodik az egy sejt eredetű klónok között. Az MSC klónok közötti különbségek részben az immunregulatív faktorok előállításáért felelős enzimeket kódoló gének eltérő kifejeződésével magyarázhatóak. Ebben a tekintetben, az NO a meghatározó szerepű faktor, a PGE2 részt vesz a klónok által kifejtett immunszuppresszióban, míg az IDO1-nek nincs szerepe benne. Ennek a munkának az egyik fontos üzenete az, hogy a gyulladással környezetben található citokinek úgy mint az IFN- $\gamma$  és a TNF- $\alpha$  eltolják, polarizálják az MSC-ket egy erőteljesen immunszuppresszív fenotípus irányába, míg differenciálódási képességük és érképződést elősegítő hatásuk gyengül, vagy teljesen meg is szűnik (26. ábra). Gyulladással citokinekkel való kezeléssel, ún. citokinavatással, az MSC klónok közötti immunfunkciót illető különbségek eltüntethetőek. Érdekes megfontolni ennek a vizsgálatnak az eredményeit az immunológiai terápiás felhasználást megelőzően, illetve felvetődik a kérdés, hogy regeneratív orvoslásban az MSC-k szövetregenerációt elősegítő hatását lehetne-e fokozni a sérülés helyén fellépő gyulladással enyhítése által.

	Nem stimulált			IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ -stimulált		Citokinkezelés hatása
	MSC2	MSC6		MSC2	MSC6	
Csontképző sejt differenciáció	+++ különböző	+ hasonló	→	- has onló	- has onló	↓
Prevascularis struktúra teszt	+++++	+++++	→	- has onló	- has onló	↓
T-sejt proliferáció gátlás	+++++	+ különböző	→	+++++	+++++	↑
DTH reakció gátlás	+++++	+ különböző	→	+++++	+++++	↑

**26. ábra.** A gyulladással környezet hatása az MSC2 és MSC6 klónok funkcióira. A + jelek száma arra utal, hogy az MSC-k az adott funkciót milyen mértékben képesek véghez vinni. A – jel a funkció hiányát jelzi. A nyilak színe és iránya a citokinkezelés hatását jelzi az adott MSC funkcióra: piros, lefelé mutató nyíl – funkció csökkenés; zöld, felfelé mutató nyíl – funkció növekedés.

## VII. Irodalomjegyzék

1. Friedenstein, A. J., Chailakhyan, R. K., and Gerasimov, U. V. (1987) Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell and tissue kinetics* **20**, 263-272
2. Bianco, P., Riminucci, M., Gronthos, S., and Robey, P. G. (2001) Bone marrow stromal stem cells: nature, biology, and potential applications. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **19**, 180-192
3. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., and Bianco, P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* **131**, 324-336
4. Caplan, A. I. (1991) Mesenchymal stem cells. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* **9**, 641-650
5. De Bari, C., Dell'Accio, F., Tylzanowski, P., and Luyten, F. P. (2001) Multipotent mesenchymal stem cells from adult human synovial membrane. *Arthritis and rheumatism* **44**, 1928-1942
6. Kuznetsov, S. A., Mankani, M. H., Gronthos, S., Satomura, K., Bianco, P., and Robey, P. G. (2001) Circulating skeletal stem cells. *The Journal of cell biology* **153**, 1133-1140
7. Zuk, P. A., Zhu, M., Mizuno, H., Huang, J., Futrell, J. W., Katz, A. J., Benhaim, P., Lorenz, H. P., and Hedrick, M. H. (2001) Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue engineering* **7**, 211-228
8. Salingcarnboriboon, R., Yoshitake, H., Tsuji, K., Obinata, M., Amagasa, T., Nifuji, A., and Noda, M. (2003) Establishment of tendon-derived cell lines exhibiting pluripotent mesenchymal stem cell-like property. *Experimental cell research* **287**, 289-300
9. Alsalameh, S., Amin, R., Gemba, T., and Lotz, M. (2004) Identification of mesenchymal progenitor cells in normal and osteoarthritic human articular cartilage. *Arthritis and rheumatism* **50**, 1522-1532
10. Lee, O. K., Kuo, T. K., Chen, W. M., Lee, K. D., Hsieh, S. L., and Chen, T. H. (2004) Isolation of multipotent mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. *Blood* **103**, 1669-1675
11. Seo, B. M., Miura, M., Gronthos, S., Bartold, P. M., Batouli, S., Brahim, J., Young, M., Robey, P. G., Wang, C. Y., and Shi, S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* **364**, 149-155
12. Tsai, M. S., Lee, J. L., Chang, Y. J., and Hwang, S. M. (2004) Isolation of human multipotent mesenchymal stem cells from second-trimester amniotic fluid using a novel two-stage culture protocol. *Human reproduction (Oxford, England)* **19**, 1450-1456
13. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *Journal of cell science* **119**, 2204-2213
14. Kolf, C. M., Cho, E., and Tuan, R. S. (2007) Mesenchymal stromal cells. Biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy* **9**, 204
15. Boxall, S. A., and Jones, E. (2012) Markers for characterization of bone marrow multipotential stromal cells. *Stem cells international* **2012**, 975871

16. Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F., and Prockop, D. J. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood* **103**, 1662-1668
17. Hegyi, B., Sagi, B., Kovacs, J., Kiss, J., Urban, V. S., Meszaros, G., Monostori, E., and Uher, F. (2010) Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *International immunology* **22**, 551-559
18. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* **8**, 315-317
19. Halfon, S., Abramov, N., Grinblat, B., and Ginis, I. (2011) Markers distinguishing mesenchymal stem cells from fibroblasts are downregulated with passaging. *Stem cells and development* **20**, 53-66
20. Caplan, A. I., and Correa, D. (2011) The MSC: an injury drugstore. *Cell stem cell* **9**, 11-15
21. Caplan, A. I. (2008) All MSCs are pericytes? *Cell stem cell* **3**, 229-230
22. Rehman, J., Traktuev, D., Li, J., Merfeld-Clauss, S., Temm-Grove, C. J., Bovenkerk, J. E., Pell, C. L., Johnstone, B. H., Considine, R. V., and March, K. L. (2004) Secretion of angiogenic and antiapoptotic factors by human adipose stromal cells. *Circulation* **109**, 1292-1298
23. Sorrell, J. M., Baber, M. A., and Caplan, A. I. (2009) Influence of adult mesenchymal stem cells on in vitro vascular formation. *Tissue engineering. Part A* **15**, 1751-1761
24. Bernardo, M. E., and Fibbe, W. E. (2013) Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell* **13**, 392-402
25. Lazarus, H. M., Haynesworth, S. E., Gerson, S. L., Rosenthal, N. S., and Caplan, A. I. (1995) Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation* **16**, 557-564
26. Wei, X., Yang, X., Han, Z. P., Qu, F. F., Shao, L., and Shi, Y. F. (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta pharmacologica Sinica* **34**, 747-754
27. Swart, J. F., and Wulffraat, N. M. (2014) Mesenchymal stromal cells for treatment of arthritis. *Best practice & research. Clinical rheumatology* **28**, 589-603
28. Wang, Y., Yuan, M., Guo, Q. Y., Lu, S. B., and Peng, J. (2014) Mesenchymal stem cells for treating articular cartilage defects and osteoarthritis. *Cell transplantation*
29. Sun, L., Akiyama, K., Zhang, H., Yamaza, T., Hou, Y., Zhao, S., Xu, T., Le, A., and Shi, S. (2009) Mesenchymal stem cell transplantation reverses multiorgan dysfunction in systemic lupus erythematosus mice and humans. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 1421-1432
30. Sun, L., Wang, D., Liang, J., Zhang, H., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., Ye, S., Hu, X., Xu, W., Zeng, X., Hou, Y., Gilkeson, G. S., Silver, R. M., Lu, L., and Shi, S. (2010) Umbilical cord mesenchymal stem cell transplantation in severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism* **62**, 2467-2475

31. Sui, W., Hou, X., Che, W., Chen, J., Ou, M., Xue, W., and Dai, Y. (2013) Hematopoietic and mesenchymal stem cell transplantation for severe and refractory systemic lupus erythematosus. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)* **148**, 186-197
32. Chen, S. L., Fang, W. W., Ye, F., Liu, Y. H., Qian, J., Shan, S. J., Zhang, J. J., Chunhua, R. Z., Liao, L. M., Lin, S., and Sun, J. P. (2004) Effect on left ventricular function of intracoronary transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cell in patients with acute myocardial infarction. *The American journal of cardiology* **94**, 92-95
33. Katritsis, D. G., Sotiropoulou, P. A., Karvouni, E., Karabinos, I., Korovesis, S., Perez, S. A., Voridis, E. M., and Papamichail, M. (2005) Transcoronary transplantation of autologous mesenchymal stem cells and endothelial progenitors into infarcted human myocardium. *Catheterization and cardiovascular interventions : official journal of the Society for Cardiac Angiography & Interventions* **65**, 321-329
34. Meyer, G. P., Wollert, K. C., Lotz, J., Pirr, J., Rager, U., Lippolt, P., Hahn, A., Fichtner, S., Schaefer, A., Arseniev, L., Ganser, A., and Drexler, H. (2009) Intracoronary bone marrow cell transfer after myocardial infarction: 5-year follow-up from the randomized-controlled BOOST trial. *European heart journal* **30**, 2978-2984
35. Hare, J. M., Traverse, J. H., Henry, T. D., Dib, N., Strumpf, R. K., Schulman, S. P., Gerstenblith, G., DeMaria, A. N., Denktas, A. E., Gammon, R. S., Hermiller, J. B., Jr., Reisman, M. A., Schaer, G. L., and Sherman, W. (2009) A randomized, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation study of intravenous adult human mesenchymal stem cells (prochymal) after acute myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **54**, 2277-2286
36. Houtgraaf, J. H., den Dekker, W. K., van Dalen, B. M., Springeling, T., de Jong, R., van Geuns, R. J., Geleijnse, M. L., Fernandez-Aviles, F., Zijlstra, F., Serruys, P. W., and Duckers, H. J. (2012) First experience in humans using adipose tissue-derived regenerative cells in the treatment of patients with ST-segment elevation myocardial infarction. *Journal of the American College of Cardiology* **59**, 539-540
37. Dalal, J., Gandy, K., and Domen, J. (2012) Role of mesenchymal stem cell therapy in Crohn's disease. *Pediatric research* **71**, 445-451
38. Amorin, B., Alegretti, A. P., Valim, V., Pezzi, A., Laureano, A. M., da Silva, M. A., Wieck, A., and Silla, L. (2014) Mesenchymal stem cell therapy and acute graft-versus-host disease: a review. *Human cell* **27**, 137-150
39. Shah, K. (2012) Mesenchymal stem cells engineered for cancer therapy. *Advanced drug delivery reviews* **64**, 739-748
40. Pittenger, M., Vanguri, P., Simonetti, D., and Young, R. (2002) Adult mesenchymal stem cells: potential for muscle and tendon regeneration and use in gene therapy. *Journal of musculoskeletal & neuronal interactions* **2**, 309-320
41. Lee, J. Y., Zhou, Z., Taub, P. J., Ramcharan, M., Li, Y., Akinbiyi, T., Maharam, E. R., Leong, D. J., Laudier, D. M., Ruike, T., Torina, P. J., Zaidi, M., Majeska, R. J., Schaffler, M. B., Flatow, E. L., and Sun, H. B. (2011) BMP-12 treatment of adult mesenchymal stem cells in vitro augments tendon-like tissue formation and defect repair in vivo. *PLoS One* **6**, e17531
42. Toma, C., Pittenger, M. F., Cahill, K. S., Byrne, B. J., and Kessler, P. D. (2002) Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation* **105**, 93-98

43. Murphy, J. M., Fink, D. J., Hunziker, E. B., and Barry, F. P. (2003) Stem cell therapy in a caprine model of osteoarthritis. *Arthritis and rheumatism* **48**, 3464-3474
44. Nagaya, N., Kangawa, K., Itoh, T., Iwase, T., Murakami, S., Miyahara, Y., Fujii, T., Uematsu, M., Ohgushi, H., Yamagishi, M., Tokudome, T., Mori, H., Miyatake, K., and Kitamura, S. (2005) Transplantation of mesenchymal stem cells improves cardiac function in a rat model of dilated cardiomyopathy. *Circulation* **112**, 1128-1135
45. Granero-Molto, F., Weis, J. A., Miga, M. I., Landis, B., Myers, T. J., O'Rear, L., Longobardi, L., Jansen, E. D., Mortlock, D. P., and Spagnoli, A. (2009) Regenerative effects of transplanted mesenchymal stem cells in fracture healing. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 1887-1898
46. Murphy, M. B., Moncivais, K., and Caplan, A. I. (2013) Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine. *Exp Mol Med* **45**, e54
47. Tsuji, K., Bandyopadhyay, A., Harfe, B. D., Cox, K., Kakar, S., Gerstenfeld, L., Einhorn, T., Tabin, C. J., and Rosen, V. (2006) BMP2 activity, although dispensable for bone formation, is required for the initiation of fracture healing. *Nature genetics* **38**, 1424-1429
48. Kim, H., Choi, S.-M., and Kim, H.-S. (2013) Mesenchymal stem cell-derived secretome and microvesicles as a cell-free therapeutics for neurodegenerative disorders. *Tissue Eng Regen Med* **10**, 93-101
49. Baglio, S. R., Pegtel, D. M., and Baldini, N. (2012) Mesenchymal stem cell secreted vesicles provide novel opportunities in (stem) cell-free therapy. *Frontiers in physiology* **3**, 359
50. Kinnaird, T., Stabile, E., Burnett, M. S., Shou, M., Lee, C. W., Barr, S., Fuchs, S., and Epstein, S. E. (2004) Local delivery of marrow-derived stromal cells augments collateral perfusion through paracrine mechanisms. *Circulation* **109**, 1543-1549
51. Gnecci, M., He, H., Noiseux, N., Liang, O. D., Zhang, L., Morello, F., Mu, H., Melo, L. G., Pratt, R. E., Ingwall, J. S., and Dzau, V. J. (2006) Evidence supporting paracrine hypothesis for Akt-modified mesenchymal stem cell-mediated cardiac protection and functional improvement. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* **20**, 661-669
52. Parekkadan, B., van Poll, D., Sukanuma, K., Carter, E. A., Berthiaume, F., Tilles, A. W., and Yarmush, M. L. (2007) Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One* **2**, e941
53. Curley, G. F., Hayes, M., Ansari, B., Shaw, G., Ryan, A., Barry, F., O'Brien, T., O'Toole, D., and Laffey, J. G. (2012) Mesenchymal stem cells enhance recovery and repair following ventilator-induced lung injury in the rat. *Thorax* **67**, 496-501
54. Chuang, T. J., Lin, K. C., Chio, C. C., Wang, C. C., Chang, C. P., and Kuo, J. R. (2012) Effects of secretome obtained from normoxia-preconditioned human mesenchymal stem cells in traumatic brain injury rats. *The journal of trauma and acute care surgery* **73**, 1161-1167
55. Gatti, S., Bruno, S., Deregibus, M. C., Sordi, A., Cantaluppi, V., Tetta, C., and Camussi, G. (2011) Microvesicles derived from human adult mesenchymal stem cells protect against ischaemia-reperfusion-induced acute and chronic kidney injury. *Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association* **26**, 1474-1483

56. Pacini, S., and Petrini, I. (2014) Are MSCs angiogenic cells? New insights on human nestin-positive bone marrow-derived multipotent cells. *Frontiers in cell and developmental biology* **2**, 20
57. Oswald, J., Boxberger, S., Jorgensen, B., Feldmann, S., Ehninger, G., Bornhauser, M., and Werner, C. (2004) Mesenchymal stem cells can be differentiated into endothelial cells in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **22**, 377-384
58. Liu, J. W., Dunoyer-Geindre, S., Serre-Beinier, V., Mai, G., Lambert, J. F., Fish, R. J., Pernod, G., Buehler, L., Bounameaux, H., and Kruithof, E. K. (2007) Characterization of endothelial-like cells derived from human mesenchymal stem cells. *Journal of thrombosis and haemostasis : JTH* **5**, 826-834
59. Roobrouck, V. D., Clavel, C., Jacobs, S. A., Ulloa-Montoya, F., Crippa, S., Sohni, A., Roberts, S. J., Luyten, F. P., Van Gool, S. W., Sampaolesi, M., Delforge, M., Lutun, A., and Verfaillie, C. M. (2011) Differentiation potential of human postnatal mesenchymal stem cells, mesoangioblasts, and multipotent adult progenitor cells reflected in their transcriptome and partially influenced by the culture conditions. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **29**, 871-882
60. Jazayeri, M., Allameh, A., Soleimani, M., Jazayeri, S. H., Piryaee, A., and Kazemnejad, S. (2008) Molecular and ultrastructural characterization of endothelial cells differentiated from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell biology international* **32**, 1183-1192
61. Crisan, M., Yap, S., Casteilla, L., Chen, C. W., Corselli, M., Park, T. S., Andriolo, G., Sun, B., Zheng, B., Zhang, L., Norotte, C., Teng, P. N., Traas, J., Schugar, R., Deasy, B. M., Badylak, S., Buhring, H. J., Giacobino, J. P., Lazzari, L., Huard, J., and Peault, B. (2008) A perivascular origin for mesenchymal stem cells in multiple human organs. *Cell stem cell* **3**, 301-313
62. Blocki, A., Wang, Y., Koch, M., Peh, P., Beyer, S., Law, P., Hui, J., and Raghunath, M. (2013) Not all MSCs can act as pericytes: functional in vitro assays to distinguish pericytes from other mesenchymal stem cells in angiogenesis. *Stem cells and development* **22**, 2347-2355
63. Hoshino, A., Chiba, H., Nagai, K., Ishii, G., and Ochiai, A. (2008) Human vascular adventitial fibroblasts contain mesenchymal stem/progenitor cells. *Biochem Biophys Res Commun* **368**, 305-310
64. Au, P., Tam, J., Fukumura, D., and Jain, R. K. (2008) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells facilitate engineering of long-lasting functional vasculature. *Blood* **111**, 4551-4558
65. Wu, Y., Chen, L., Scott, P. G., and Tredget, E. E. (2007) Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 2648-2659
66. Hung, S. C., Pochampally, R. R., Chen, S. C., Hsu, S. C., and Prockop, D. J. (2007) Angiogenic effects of human multipotent stromal cell conditioned medium activate the PI3K-Akt pathway in hypoxic endothelial cells to inhibit apoptosis, increase survival, and stimulate angiogenesis. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 2363-2370
67. Togel, F., Weiss, K., Yang, Y., Hu, Z., Zhang, P., and Westenfelder, C. (2007) Vasculotropic, paracrine actions of infused mesenchymal stem cells are important to the recovery from acute kidney injury. *American journal of physiology. Renal physiology* **292**, F1626-1635
68. Duffy, G. P., Ahsan, T., O'Brien, T., Barry, F., and Nerem, R. M. (2009) Bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote angiogenic processes in a time- and dose-dependent manner in vitro. *Tissue engineering. Part A* **15**, 2459-2470

69. Potapova, I. A., Gaudette, G. R., Brink, P. R., Robinson, R. B., Rosen, M. R., Cohen, I. S., and Doronin, S. V. (2007) Mesenchymal stem cells support migration, extracellular matrix invasion, proliferation, and survival of endothelial cells in vitro. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 1761-1768
70. Boomsma, R. A., and Geenen, D. L. (2012) Mesenchymal stem cells secrete multiple cytokines that promote angiogenesis and have contrasting effects on chemotaxis and apoptosis. *PLoS One* **7**, e35685
71. Szebeni, G. J., Kriston-Pál, É., Blazsó, P., Katona, R. L., Novák, J., Szabó, E., Czibula, Á., Fajka-Boja, R., Hegyi, B., Uher, F., Krenács, L., Joó, G., and Monostori, É. (2012) Identification of Galectin-1 as a Critical Factor in Function of Mouse Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Tumor Promotion. *PLoS ONE* **7**, e41372
72. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., and Hoffman, R. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* **30**, 42-48
73. Mendez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., MacArthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma'ayan, A., Enikolopov, G. N., and Frenette, P. S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* **466**, 829-834
74. Haniffa, M. A., Wang, X. N., Holtick, U., Rae, M., Isaacs, J. D., Dickinson, A. M., Hilkens, C. M., and Collin, M. P. (2007) Adult human fibroblasts are potent immunoregulatory cells and functionally equivalent to mesenchymal stem cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 1595-1604
75. Jones, S., Horwood, N., Cope, A., and Dazzi, F. (2007) The antiproliferative effect of mesenchymal stem cells is a fundamental property shared by all stromal cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **179**, 2824-2831
76. Huber, L. C., Distler, O., Tarner, I., Gay, R. E., Gay, S., and Pap, T. (2006) Synovial fibroblasts: key players in rheumatoid arthritis. *Rheumatology (Oxford, England)* **45**, 669-675
77. Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* **6**, 13
78. Kim, J., and Hematti, P. (2009) Mesenchymal stem cell-educated macrophages: a novel type of alternatively activated macrophages. *Experimental hematology* **37**, 1445-1453
79. Cho, D. I., Kim, M. R., Jeong, H. Y., Jeong, H. C., Jeong, M. H., Yoon, S. H., Kim, Y. S., and Ahn, Y. (2014) Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Exp Mol Med* **46**, e70
80. Witko-Sarsat, V., Rieu, P., Descamps-Latscha, B., Lesavre, P., and Halbwachs-Mecarelli, L. (2000) Neutrophils: Molecules, Functions and Pathophysiological Aspects. *Lab Invest* **80**, 617-653
81. Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., and Pistoia, V. (2008) Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 151-162
82. Brandau, S., Jakob, M., Bruderek, K., Bootz, F., Giebel, B., Radtke, S., Mauer, K., Jäger, M., Flohe, S. B., and Lang, S. (2014) Mesenchymal stem cells augment the anti-bacterial activity of neutrophil granulocytes. *PLoS One* **9**, e106903

83. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., and Papamichail, M. (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 74-85
84. Spaggiari, G. M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M. C., and Moretta, L. (2008) Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2,3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* **111**, 1327-1333
85. Thomas, H., Jager, M., Mauel, K., Brandau, S., Lask, S., and Flohe, S. B. (2014) Interaction with mesenchymal stem cells provokes natural killer cells for enhanced IL-12/IL-18-induced interferon-gamma secretion. *Mediators of inflammation* **2014**, 143463
86. Chiesa, S., Morbelli, S., Morando, S., Massollo, M., Marini, C., Bertoni, A., Frassoni, F., Bartolome, S. T., Sambuceti, G., Traggiai, E., and Uccelli, A. (2011) Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **108**, 17384-17389
87. Zhang, Y., Cai, W., Huang, Q., Gu, Y., Shi, Y., Huang, J., Zhao, F., Liu, Q., Wei, X., Jin, M., Wu, C., Xie, Q., Zhang, Y., Wan, B., and Zhang, Y. (2014) Mesenchymal stem cells alleviate bacteria-induced liver injury in mice by inducing regulatory dendritic cells. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **59**, 671-682
88. Franquesa, M., Hoogduijn, M. J., Bestard, O., and Grinyó, J. M. (2012) Immunomodulatory effect of Mesenchymal Stem Cells on B cells. *Frontiers in Immunology* **3**
89. Zhou, K., Zhang, H., Jin, O., Feng, X., Yao, G., Hou, Y., and Sun, L. (2008) Transplantation of human bone marrow mesenchymal stem cell ameliorates the autoimmune pathogenesis in MRL/lpr mice. *Cellular & molecular immunology* **5**, 417-424
90. Gerdoni, E., Gallo, B., Casazza, S., Musio, S., Bonanni, I., Pedemonte, E., Mantegazza, R., Frassoni, F., Mancardi, G., Pedotti, R., and Uccelli, A. (2007) Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology* **61**, 219-227
91. English, K., Barry, F. P., Field-Corbett, C. P., and Mahon, B. P. (2007) IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology letters* **110**, 91-100
92. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanese, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A. M. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood* **99**, 3838-3843
93. Aggarwal, S., and Pittenger, M. F. (2005) Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood* **105**, 1815-1822
94. Qu, X., Liu, X., Cheng, K., Yang, R., and Zhao, R. C. (2012) Mesenchymal stem cells inhibit Th17 cell differentiation by IL-10 secretion. *Experimental hematology* **40**, 761-770
95. Urban, V. S., Kiss, J., Kovacs, J., Gocza, E., Vas, V., Monostori, E., and Uher, F. (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 244-253
96. Li, M. O., Wan, Y. Y., Sanjabi, S., Robertson, A. K., and Flavell, R. A. (2006) Transforming growth factor-beta regulation of immune responses. *Annual review of immunology* **24**, 99-146



97. Kuroiwa, T., Kakishita, E., Hamano, T., Kataoka, Y., Seto, Y., Iwata, N., Kaneda, Y., Matsumoto, K., Nakamura, T., Ueki, T., Fujimoto, J., and Iwasaki, T. (2001) Hepatocyte growth factor ameliorates acute graft-versus-host disease and promotes hematopoietic function. *The Journal of clinical investigation* **107**, 1365-1373
98. Le Blanc, K., Tammik, C., Rosendahl, K., Zetterberg, E., and Ringden, O. (2003) HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental hematology* **31**, 890-896
99. Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'Huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B., and Shi, Y. (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **27**, 1954-1962
100. Le Fricc, G., Laupeze, B., Fardel, O., Sebti, Y., Pangault, C., Guilloux, V., Beauplet, A., Fauchet, R., and Amiot, L. (2003) Soluble HLA-G inhibits human dendritic cell-triggered allogeneic T-cell proliferation without altering dendritic differentiation and maturation processes. *Human immunology* **64**, 752-761
101. Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., Rouas-Freiss, N., Carosella, E. D., and Deschaseaux, F. (2008) Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 212-222
102. Rizzo, R., Campioni, D., Stignani, M., Melchiorri, L., Bagnara, G. P., Bonsi, L., Alviano, F., Lanzoni, G., Moretti, S., Cuneo, A., Lanza, F., and Baricordi, O. R. (2008) A functional role for soluble HLA-G antigens in immune modulation mediated by mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* **10**, 364-375
103. Nasef, A., Mathieu, N., Chapel, A., Frick, J., Francois, S., Mazurier, C., Boutarfa, A., Bouchet, S., Gorin, N. C., Thierry, D., and Fouillard, L. (2007) Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation* **84**, 231-237
104. Sreeramkumar, V., Fresno, M., and Cuesta, N. (2012) Prostaglandin E2 and T cells: friends or foes? *Immunology and cell biology* **90**, 579-586
105. Rasmusson, I., Ringden, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2005) Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Experimental cell research* **305**, 33-41
106. Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., and Mahon, B. P. (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clinical and experimental immunology* **149**, 353-363
107. Cuerquis, J., Romieu-Mourez, R., Francois, M., Routy, J. P., Young, Y. K., Zhao, J., and Eliopoulos, N. (2014) Human mesenchymal stromal cells transiently increase cytokine production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation: effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha stimulation. *Cytotherapy* **16**, 191-202
108. Saraiva, M., and O'Garra, A. (2010) The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology* **10**, 170-181
109. Moffett, J. R., and Nambodiri, M. A. (2003) Tryptophan and the immune response. *Immunology and cell biology* **81**, 247-265
110. Meisel, R., Zibert, A., Laryea, M., Gobel, U., Daubener, W., and Dilloo, D. (2004) Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood* **103**, 4619-4621

111. Francois, M., Romieu-Mourez, R., Li, M., and Galipeau, J. (2012) Human MSC suppression correlates with cytokine induction of indoleamine 2,3-dioxygenase and bystander M2 macrophage differentiation. *Molecular therapy : the journal of the American Society of Gene Therapy* **20**, 187-195
112. Su, J., Chen, X., Huang, Y., Li, W., Li, J., Cao, K., Cao, G., Zhang, L., Li, F., Roberts, A. I., Kang, H., Yu, P., Ren, G., Ji, W., Wang, Y., and Shi, Y. (2014) Phylogenetic distinction of iNOS and IDO function in mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression in mammalian species. *Cell Death Differ* **21**, 388-396
113. Xu, G., Zhang, L., Ren, G., Yuan, Z., Zhang, Y., Zhao, R. C., and Shi, Y. (2007) Immunosuppressive properties of cloned bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell research* **17**, 240-248
114. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* **109**, 228-234
115. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., and Shi, Y. (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell* **2**, 141-150
116. Djouad, F., Charbonnier, L. M., Bouffi, C., Louis-Pence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noel, D. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **25**, 2025-2032
117. Keir, M. E., Butte, M. J., Freeman, G. J., and Sharpe, A. H. (2008) PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annual review of immunology* **26**, 677-704
118. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2007) Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis and rheumatism* **56**, 1175-1186
119. Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., and Li, N. (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
120. Scheller, J., Chalaris, A., Schmidt-Arras, D., and Rose-John, S. (2011) The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochimica et biophysica acta* **1813**, 878-888
121. Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., and Noel, D. (2010) IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* **5**, e14247
122. Korhonen, R., Lahti, A., Kankaanranta, H., and Moilanen, E. (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy* **4**, 471-479
123. Tayeh, M. A., and Marletta, M. A. (1989) Macrophage oxidation of L-arginine to nitric oxide, nitrite, and nitrate. Tetrahydrobiopterin is required as a cofactor. *The Journal of biological chemistry* **264**, 19654-19658
124. Schneemann, M., and Schoeden, G. (2007) Macrophage biology and immunology: man is not a mouse. *Journal of leukocyte biology* **81**, 579; discussion 580
125. Meisel, R., Brockers, S., Heseler, K., Degistirici, O., Bulle, H., Woite, C., Stuhlsatz, S., Schwippert, W., Jager, M., Sorg, R., Henschler, R., Seissler, J., Dilloo, D., and Daubener, W. (2011) Human but not murine multipotent

- mesenchymal stromal cells exhibit broad-spectrum antimicrobial effector function mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Leukemia* **25**, 648-654
126. O'Shea, J. J., Ma, A., and Lipsky, P. (2002) Cytokines and autoimmunity. *Nature reviews. Immunology* **2**, 37-45
  127. Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N., and Ren, G. (2010) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell research* **20**, 510-518
  128. Krampera, M. (2011) Mesenchymal stromal cell 'licensing': a multistep process. *Leukemia* **25**, 1408-1414
  129. Gilbert, L. C., Rubin, J., and Nanes, M. S. (2005) The p55 TNF receptor mediates TNF inhibition of osteoblast differentiation independently of apoptosis. *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* **288**, E1011-1018
  130. Lacey, D. C., Simmons, P. J., Graves, S. E., and Hamilton, J. A. (2009) Proinflammatory cytokines inhibit osteogenic differentiation from stem cells: implications for bone repair during inflammation. *Osteoarthritis and cartilage / OARS, Osteoarthritis Research Society* **17**, 735-742
  131. Liu, Y., Wang, L., Kikuri, T., Akiyama, K., Chen, C., Xu, X., Yang, R., Chen, W., Wang, S., and Shi, S. (2011) Mesenchymal stem cell-based tissue regeneration is governed by recipient T lymphocytes via IFN-gamma and TNF-alpha. *Nature medicine* **17**, 1594-1601
  132. Yang, N., Wang, G., Hu, C., Shi, Y., Liao, L., Shi, S., Cai, Y., Cheng, S., Wang, X., Liu, Y., Tang, L., Ding, Y., and Jin, Y. (2013) Tumor necrosis factor alpha suppresses the mesenchymal stem cell osteogenesis promoter miR-21 in estrogen deficiency-induced osteoporosis. *Journal of bone and mineral research : the official journal of the American Society for Bone and Mineral Research* **28**, 559-573
  133. Hess, K., Ushmorov, A., Fiedler, J., Brenner, R. E., and Wirth, T. (2009) TNFalpha promotes osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells by triggering the NF-kappaB signaling pathway. *Bone* **45**, 367-376
  134. Osta, B., Lavocat, F., Eljaafari, A., and Miossec, P. (2014) Effects of Interleukin-17A on Osteogenic Differentiation of Isolated Human Mesenchymal Stem Cells. *Front Immunol* **5**, 425
  135. Huang, H., Zhao, N., Xu, X., Xu, Y., Li, S., Zhang, J., and Yang, P. (2011) Dose-specific effects of tumor necrosis factor alpha on osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Cell proliferation* **44**, 420-427
  136. Suzawa, M., Takada, I., Yanagisawa, J., Ohtake, F., Ogawa, S., Yamauchi, T., Kadowaki, T., Takeuchi, Y., Shibuya, H., Gotoh, Y., Matsumoto, K., and Kato, S. (2003) Cytokines suppress adipogenesis and PPAR-gamma function through the TAK1/TAB1/NIK cascade. *Nature cell biology* **5**, 224-230
  137. Liu, Y., Han, Z. P., Zhang, S. S., Jing, Y. Y., Bu, X. X., Wang, C. Y., Sun, K., Jiang, G. C., Zhao, X., Li, R., Gao, L., Zhao, Q. D., Wu, M. C., and Wei, L. X. (2011) Effects of inflammatory factors on mesenchymal stem cells and their role in the promotion of tumor angiogenesis in colon cancer. *The Journal of biological chemistry* **286**, 25007-25015
  138. Liotta, F., Angeli, R., Cosmi, L., Fili, L., Manuelli, C., Frosali, F., Mazzinghi, B., Maggi, L., Pasini, A., Lisi, V., Santarlaschi, V., Consoloni, L., Angelotti, M. L., Romagnani, P., Parronchi, P., Krampera, M., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2008) Toll-like receptors 3 and 4 are expressed by human bone

- marrow-derived mesenchymal stem cells and can inhibit their T-cell modulatory activity by impairing Notch signaling. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **26**, 279-289
139. Romieu-Mourez, R., Francois, M., Boivin, M. N., Bouchentouf, M., Spaner, D. E., and Galipeau, J. (2009) Cytokine modulation of TLR expression and activation in mesenchymal stromal cells leads to a proinflammatory phenotype. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **182**, 7963-7973
  140. Tisato, V., Naresh, K., Girdlestone, J., Navarrete, C., and Dazzi, F. (2007) Mesenchymal stem cells of cord blood origin are effective at preventing but not treating graft-versus-host disease. *Leukemia* **21**, 1992-1999
  141. Yanez, R., Lamana, M. L., Garcia-Castro, J., Colmenero, I., Ramirez, M., and Bueren, J. A. (2006) Adipose tissue-derived mesenchymal stem cells have in vivo immunosuppressive properties applicable for the control of the graft-versus-host disease. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 2582-2591
  142. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., and Uccelli, A. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood* **106**, 1755-1761
  143. Polchert, D., Sobinsky, J., Douglas, G. W., Kidd, M., Moadsiri, A., Reina, E., Genrich, K., Mehrotra, S., Setty, S., Smith, B., and Bartholomew, A. (2008) IFN- $\gamma$  activation of mesenchymal stem cells for treatment and prevention of graft versus host disease. *European journal of immunology* **38**, 1745-1755
  144. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2006) Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)* **24**, 386-398
  145. Hemeda, H., Jakob, M., Ludwig, A. K., Giebel, B., Lang, S., and Brandau, S. (2010) Interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha differentially affect cytokine expression and migration properties of mesenchymal stem cells. *Stem cells and development* **19**, 693-706
  146. Pevsner-Fischer, M., Levin, S., and Zipori, D. (2011) The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem cell reviews* **7**, 560-568
  147. Phinney, D. G., Kopen, G., Righter, W., Webster, S., Tremain, N., and Prockop, D. J. (1999) Donor variation in the growth properties and osteogenic potential of human marrow stromal cells. *Journal of cellular biochemistry* **75**, 424-436
  148. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999) Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science (New York, N.Y.)* **284**, 143-147
  149. Muraglia, A., Cancedda, R., and Quarto, R. (2000) Clonal mesenchymal progenitors from human bone marrow differentiate in vitro according to a hierarchical model. *Journal of cell science* **113 ( Pt 7)**, 1161-1166
  150. Russell, K. C., Lacey, M. R., Gilliam, J. K., Tucker, H. A., Phinney, D. G., and O'Connor, K. C. (2011) Clonal analysis of the proliferation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells as a function of potency. *Biotechnology and bioengineering* **108**, 2716-2726
  151. Okamoto, T., Aoyama, T., Nakayama, T., Nakamata, T., Hosaka, T., Nishijo, K., Nakamura, T., Kiyono, T., and Toguchida, J. (2002) Clonal heterogeneity in

- differentiation potential of immortalized human mesenchymal stem cells. *Biochem Biophys Res Commun* **295**, 354-361
152. Guilak, F., Lott, K. E., Awad, H. A., Cao, Q., Hicok, K. C., Fermor, B., and Gimble, J. M. (2006) Clonal analysis of the differentiation potential of human adipose-derived adult stem cells. *Journal of cellular physiology* **206**, 229-237
  153. Lei, J., Hui, D., Huang, W., Liao, Y., Yang, L., Liu, L., Zhang, Q., Qi, G., Song, W., Zhang, Y., Xiang, A. P., and Zhou, Q. (2013) Heterogeneity of the biological properties and gene expression profiles of murine bone marrow stromal cells. *The international journal of biochemistry & cell biology* **45**, 2431-2443
  154. Jeon, M. S., Yi, T. G., Lim, H. J., Moon, S. H., Lee, M. H., Kang, J. S., Kim, C. S., Lee, D. H., and Song, S. U. (2011) Characterization of mouse clonal mesenchymal stem cell lines established by subfractionation culturing method. *World journal of stem cells* **3**, 70-82
  155. Garlanda, C., Parravicini, C., Sironi, M., De Rossi, M., Wainstok de Calmanovici, R., Carozzi, F., Bussolino, F., Colotta, F., Mantovani, A., and Vecchi, A. (1994) Progressive growth in immunodeficient mice and host cell recruitment by mouse endothelial cells transformed by polyoma middle-sized T antigen: implications for the pathogenesis of opportunistic vascular tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **91**, 7291-7295
  156. Gyorfy, Z., Benko, S., Kusz, E., Maresca, B., Vigh, L., and Duda, E. (1997) Highly Increased TNF Sensitivity of Tumor Cells Expressing the Yeast  $\Delta 9$ -Desaturase Gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **241**, 465-470
  157. Phinney, D. G. (2012) Functional heterogeneity of mesenchymal stem cells: implications for cell therapy. *Journal of cellular biochemistry* **113**, 2806-2812
  158. Levin, S., Pevsner-Fischer, M., Kagan, S., Lifshitz, H., Weinstock, A., Gataulin, D., Friedlander, G., and Zipori, D. (2014) Divergent levels of LBP and TGFbeta1 in murine MSCs lead to heterogenic response to TLR and proinflammatory cytokine activation. *Stem cell reviews* **10**, 376-388
  159. Chen, L., Tredget, E. E., Wu, P. Y. G., and Wu, Y. (2008) Paracrine Factors of Mesenchymal Stem Cells Recruit Macrophages and Endothelial Lineage Cells and Enhance Wound Healing. *PLoS ONE* **3**, e1886
  160. Kleinert, H., Schwarz, P. M., and Forstermann, U. (2003) Regulation of the expression of inducible nitric oxide synthase. *Biological chemistry* **384**, 1343-1364
  161. Soderberg, M., Raffalli-Mathieu, F., and Lang, M. A. (2007) Identification of a regulatory cis-element within the 3'-untranslated region of the murine inducible nitric oxide synthase (iNOS) mRNA; interaction with heterogeneous nuclear ribonucleoproteins I and L and role in the iNOS gene expression. *Molecular immunology* **44**, 434-442
  162. Hucke, C., MacKenzie, C. R., Adjogble, K. D., Takikawa, O., and Daubener, W. (2004) Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infection and immunity* **72**, 2723-2730

## VIII. Saját közlemények

### Az értekezéshez kapcsolódó folyóirat cikkek:

- 1) Szabó, E., Fajka-Boja, R., Kriston-Pál, É., Hornung, Á., Makra, I., Kudlik, G., Uher, F., Katona, R. L., Monostori, É. and Czibula, Á. (2015) Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells and Development* **24**, 2171-2180. **IF(2014): 3.727**
- 2) Szebeni, G. J., Kriston-Pál, É., Blaszó, P., Katona, R. L., Novák, J., Szabó, E., Czibula, Á., Fajka-Boja, R., Hegyi, B., Uher, F., Krenács, L., Joó, G., and Monostori, É. (2012) Identification of Galectin-1 as a Critical Factor in Function of Mouse Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Tumor Promotion. *PLoS ONE* **7**, e41372. **IF(2012): 3.730**

### Egyéb folyóirat cikkek:

- 1) Deák, M., Hornung, Á., Novák, J., Demydenko, D., Szabó, E., Czibula, Á., Fajka-Boja, R., Kriston-Pál, É., Monostori, É. and Kovács, L. (2014) Novel role for galectin-1 in T-cells under physiological and pathological conditions. *Immunobiology* **220**, 483-489. **IF(2014): 3.044**

**Összes IF: 10.501**

### Idézhető absztraktok:

1. Hornung, Á., Deák, M., Novák, J., Szabó, E., Czibula, Á., Fajka-Boja, R., Kriston-Pál, É., Monostori, É. and Kovács, L. (2015) Novel role for galectin-1 in T-cell apoptosis regulation and its relevance to systemic lupus erythematosus. *Annals of the Rheumatic Diseases* **74**, A19 doi:10.1136/annrheumdis-2015-207259.44

### Konferencia előadások:

1. Szabó Enikő. „Csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek heterogenitásának és differenciálódási tulajdonságainak vizsgálata az MSC sejtpopuláció klónozásával és nem-specifikus RNS interferencia alkalmazásával”. 2010. évi őszi Tudományos Diákköri Konferencia. Szeged, 2010. november 18.
2. Szabó Enikő. „Csontvelői eredetű mesenchymális őssejtek heterogenitásának és differenciálódási tulajdonságainak vizsgálata az MSC sejtpopuláció klónozásával és nem-specifikus RNS interferencia alkalmazásával”. XXX. Jubileumi Országos Tudományos Diákköri Konferencia. Budapest, 2011. április 19-21.
3. Szebeni Gábor János, Kriston-Pál Éva, Blaszó Péter, Katona Róbert, Novák Julianna, Szabó Enikő, Joó Gabriella, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Czibula Ágnes, Monostori Éva „Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mesenchymal stem cell-mediated tumour promotion”, Instituto Clinico Humanitas, Milanó, 2011. december 02.

4. Szebeni Gábor János, Kriston-Pál Éva, Blazsó Péter, Katona Róbert, Novák Julianna, **Szabó Enikő**, Joó Gabriella, Hegyi Beáta, Uher Ferenc, Krenács László, Fajka-Boja Roberta, Czibula Ágnes, Monostori Éva „*A galektin-1, mint a mesenchymalis őssejtek tumorfejlődésre gyakorolt hatásában azonosított új faktor.*” Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október 12-14.
5. Kriston-Pál Éva, Szebeni Gábor János, Novák Julianna, Czibula Ágnes, **Szabó Enikő**, Fajka-Boja Roberta, Uher Ferenc, Krenács László, Monostori Éva „*A mesenchymalis őssejtek által termelt galektin-1 az érképződés serkentésével befolyásolja a tumorfejlődést*”. Magyar Immunológiai Társaság 41. Vándorgyűlése, Debrecen, 2012. október 17-19.
6. **Szabó Enikő**, Czibula Ágnes, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva, Uher Ferenc, Kudlik Gyöngyi, Katona Róbert, Monostori Éva „*Az egér csontvelői mesenchymalis őssejtek heterogenitása differenciálódás és immunszuppresszió szempontjából*” 15. Kolozsvári Biológus Napok, Kolozsvár, 2014. április 4-6.
7. **Szabó Enikő**, „*Az egér csontvelői mesenchymalis őssejtek heterogenitása differenciálódás és immunszuppresszió szempontjából*”. Szegedi Biológus Doktorandusz Konferencia 2014, Szeged, 2014. május 19-20.
8. **Szabó Enikő**, Fajka-Boja Roberta, Kriston-Pál Éva, Hornung Ákos, Makra Ildikó, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc, Katona Róbert László, Monostori Éva, Czibula Ágnes „*Licensing by inflammatory cytokines abolishes heterogeneity of immunosuppressive function of mesenchymal stem cell population*”. Molekuláris Élettudományi Konferencia (Hungarian Molecular Life Sciences Conference), Eger, 2015. március 27-29.

#### **Konferencia poszterek:**

1. **Szabó Enikő**, Czibula Ágnes, Blazsó Péter, Katona Róbert, Uher Ferenc, Monostori Éva. „*Csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek klónozása az MSC sejtpopuláció heterogenitásának vizsgálatához*”. Magyar Immunológiai Társaság 39. Vándorgyűlése, Szeged, 2010. november 3-5.
2. **Szabó Enikő**, Czibula Ágnes, Blazsó Péter, Katona Róbert, Uher Ferenc, Monostori Éva. „*Csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek heterogenitásának és differenciálódási tulajdonságainak vizsgálata*”. IX. Magyar Genetikai Kongresszus és XVI. Sejt- és Fejlődésbiológiai Napok, Siófok, 2011. március 25.-27.
3. **Szabó Enikő**, Czibula Ágnes, Blazsó Péter, Katona Róbert, Uher Ferenc, Monostori Éva „*Csontvelői eredetű mesenchymalis őssejt populáció heterogenitásának vizsgálata monoklonális sejtvonalak létrehozásával*”. Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október 12-14.
4. Kriston-Pál Éva, Szebeni Gábor János, Novák Julianna, Fajka-Boja Roberta, **Szabó Enikő**, Czibula Ágnes, Uher Ferenc, Monostori Éva. „*Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stem cell-mediated tumor promotion*”. EMBL Conference Stem Cells in Cancer and Regenerative Medicine, Heidelberg, 2012. augusztus 29.

## IX. Összefoglalás

A mesenchymalis őssejtek (MSC) multipotens felnőtt szöveti őssejtek. Megfelelő induktív környezetben mezodermális irányba differenciálódva zsír-, csont- és porcsejtekké alakulnak. Differenciálódási képességük és biológiailag aktív faktorok által kifejtett immunszuppresszív hatásuk miatt a regeneratív és immunszuppresszív medicina egyik fontos eszközei lehetnek. Így az MSC-k segítik a sérülést, szövetpusztulást követő szövetmegújulást, érképződést, illetve mérsékelhetik a sérülés helyén kialakuló gyulladáscsökkentő immunválaszt. A humán orvoslásban betöltött szerepe miatt az MSC heterogenitás megismerése fontos teendő. A heterogenitás különböző szinteken vizsgálható és vizsgálendő: 1) a különböző egyedekből izolált MSC populációk eltérőek; 2) adott egyed különböző szöveteiből kivont MSC-k morfológiailag, növekedési és differenciálódási képességüket tekintve eltérőek; 3) Adott egyed adott szövetéből izolált MSC egyes sejtjei szintén eltérőek lehetnek (klonális heterogenitás). Munkánk során az egér csontvelői MSC populáció egyedi sejtjeinek klonális különbségeit vizsgáltuk.

Ebből a célból egér csontvelői MSC kultúrából hígítással módszerrel egy sejt eredetű klónokat izoláltunk, és ezek közül öt (MSC2-6) klón tulajdonságait hasonlítottuk össze különböző szempontok alapján. A vizsgált MSC klónok morfológiája, osztódási képessége hasonló, és az MSC kritériumoknak megfelelő sejtfelszíni markerprofilal rendelkeznek: CD45<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup> és Sca-1<sup>+</sup>. Specifikus faktorok jelenlétében csontképző sejt és zsírsejt irányba differenciálódnak. A hisztokémiai festések alapján az MSC2, MSC4 és MSC5 klónok erőteljesebben, míg az MSC3 és MSC6 klónok gyengébben differenciálódnak csontképző sejt irányba. A klónok zsírsejt irányú differenciációja hasonló mértékű, amit a lipidtartalom meghatározására alkalmas áramlási citometriás méréssel igazoltunk. *In vitro* angiogenezis modellben az MSC klónok endotélsejtekkel együtt tenyésztve prevascularis struktúrákat képeznek. A struktúrák hossza és a klónok proangiogén faktor (ér-endotél növekedési faktor, angiopoietin-1, galektin-1) mRNS kifejeződése mindegyik klón esetében hasonló.

Az MSC klónok immunszabályozó tulajdonságát *in vitro* és *in vivo* modellrendszerben vizsgáltuk. Az *in vitro* MSC-T-sejt kokultúra rendszerben mindegyik klón szignifikánsan gátolja a nyirokcsomóból izolált, aktivált T-sejtek osztódását, de a gátlás mértéke a különböző klónok között nagy különbségeket mutat. Az MSC2, MSC4 és MSC5 erősen, az MSC3 és MSC6 gyengén gátolja a T-sejtek osztódását, tehát a klónok



gátlóképesség szerint a következő sorrendbe állíthatóak: MSC2  $\geq$  MSC5 > MSC4 > MSC3 >> MSC6. E különbség okának feltárására meghatároztuk az MSC klónok immunszuppresszióért felelős faktorait kódoló gének expresszióját kvantitatív valós idejű PCR-rel (qRT-PCR). A prosztaglandin-endoperoxid szintáz 2-t kódoló gén (*Ptgs2*) mindegyik klónban magasan fejeződik ki, az indolamin-2,3-dioxigenáz 1-et kódoló gén (*Ido1*) kifejeződése pedig egyik klónban sem mutatható ki. Jelentős a különbség a nitrogén-monoxid (NO) szintáz 2 (*Nos2*) génexpressziójában: az erősen gátló MSC2, MSC4 és MSC5 klónban magasan, a gyengén gátló MSC3 klónban alacsonyan, a leggyengébben gátló MSC6 klónban pedig egyáltalán nem fejeződik ki. Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a NO a T-sejt proliferáció gátlásában alapvető szerepet játszik. A NO szerepének igazolására az MSC2 és MSC6 klónt vizsgáltuk, specifikus NOS2 gátlószert, az L-NMMA-t alkalmazva. A NOS2 inhibitor teljes mértékben gátolta az erősen gátló, nagy mennyiségű *Nos2* mRNS-t expresszáló MSC2, míg nem befolyásolta a gyengén gátló, *Nos2*-t nem expresszáló MSC6 T-sejt proliferáció gátló hatását. A PGE2 termelés és az IDO1 enzimaktivitás gátlása alapján a PGE2 szerepe részleges az MSC2, míg nem befolyásolja az MSC6 T-sejt osztódás gátlását.

Az MSC klónok *in vivo* immunmoduláló képességének tanulmányozására ovalbuminnal egerekben kiváltott késői típusú túlérzékenységi reakciót (DTH) alkalmaztunk. Az *in vivo* modell alátámasztja és igazolja az *in vitro* rendszerben kapott eredményeket, mivel a T-sejt proliferáció gátlásában leghatékonyabb MSC2 szignifikánsan gátolja a DTH reakciót, míg a legkevésbé gátló MSC6 klón nem befolyásolja az ovalbuminnal kiváltott túlérzékenységi választ.

Az MSC-k differenciálódási és gyulladáscsökkentő képességét igyekeznek kiaknázni az egyre sokoldalúbb sejterápiás felhasználás során. Az MSC terápia legígéretesebb területei a csontvelő átültetés után gyakran súlyos tünetekkel fellépő immunológiai kórkép, a graft-versus-host betegség kezelése, illetve a regeneratív medicina. A terápia során a szervezetbe oltott MSC-k gyakran gyulladással környezetbe jutnak, ahol gyulladással citokinek (IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$ ) befolyásolhatják az MSC-k funkcionális tulajdonságait.

Az IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val történő előkezelés gátolja az MSC-k csont irányú differenciálódását és a folyamatot jelző gének (*Runx2*, *Bglap*, *Spp1*) kifejeződését. A gyulladáskeltő citokinek az MSC klónok proangiogén tulajdonságát is megszüntetik, mivel

az *in vitro* MSC-endotélejt kokultúrákban IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  jelenlétében a prevascularis struktúrák nem alakulnak ki.

Az MSC klónok immunszuppresszív hatásának vizsgálata során az eredmények azt támasztották alá, hogy az IFN- $\gamma$ -val és TNF- $\alpha$ -val történő előkezelés serkenti az MSC klónok T-sejt osztódásgátló aktivitását. A gátlóképesség fokozódása a gyengén gátló MSC3 és MSC6 klónokban a legkifejezettebb. Ezzel összhangban az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  kezelés indukálja az immunszuppresszióért felelős faktorokat kódoló gének (*Nos2*, *Ptgs2*, *Ido1*) kifejeződését. Az immunszuppresszív faktorok szerepét a T-sejt proliferáció gátlásban specifikus gátlószerek segítségével igazoltuk, hasonlóan, mint a nem stimulált klónok esetében. A NOS2 enzim inhibitora, az L-NMMA blokkolja az MSC2 és MSC6 (melyek gátló hatása hasonlóvá válik a citokin előkezelés után) T-sejt proliferáció gátlását, alátámasztva a NO szerepét. A PGE2 termelés gátlása indometacinnal a PGE2 részleges szerepét igazolja, míg az IDO1 inhibitorának, az 1-metil-triptofánnak a jelenléte nem befolyásolja az MSC klónok aktivitását kizárva ennek a faktornak a közreműködését.

Az *in vitro* adatokat az *in vivo* eredmények is alátámasztják. A gyulladással citokinekkal történő előkezelés megszünteti a stimulálatlan MSC2 és MSC6 klónok között tapasztalt különbséget, mivel az előkezelés hatására az MSC2 és MSC6 hasonlóan gátolja a DTH reakciót.

Eredményeink összefoglalása: a csontvelői MSC populáció funkcionálisan heterogén, ami a csont irányú differenciálódásban és még erőteljesebben az immunválasz gátlásában érvényesül. A gyulladással környezetben jelenlevő citokinek, az IFN- $\gamma$  és TNF- $\alpha$  polarizálják az MSC-k funkcióit azáltal, hogy csökken a differenciálódási képességük és angiogenezisben betöltött szerepük, míg jelentősen megnő az immunszuppresszív aktivitásuk. Ezért érdemes lehet megfontolni ennek a vizsgálatnak az eredményeit az immunológiai és regeneratív terápiás felhasználást megelőzően, vagyis az immunológiai felhasználás során az MSC-k gyulladással citokinekkal való előkezelését, regeneratív terápiában a terápiát megelőző gyulladással csökkentést.

## X. Summary

Mesenchymal stem cells (MSCs) are resident in many adult tissues. These cells are capable to differentiate into mesodermal lineages such as adipocytes, osteoblasts and chondrocytes, moreover they produce a plethora of bioactive molecules. Due to their differentiation into various cell types, production of a plethora of soluble factors including those with immunoregulatory functions and pro-angiogenic activity, MSCs have been implicated in medical applications such as regenerative medicine and treating immunological disorders. Hence the importance of mastery of heterogeneity of MSC population has emerged. Different levels of heterogeneity could be and has to be investigated: 1) MSCs from different individuals can be distinguished; 2) MSCs from various tissues of one individual are different regarding the cell morphology, growth and differentiation abilities; 3) MSCs from a given tissue of one animal may exert clonal heterogeneity. Our work aimed to examine the clonal heterogeneity of mouse bone marrow MSC.

To approach clonal heterogeneity, single cell MSC clones were generated from mouse bone marrow-derived MSC culture using limiting dilution cloning technique. The functional properties of five of these MSC clones (MSC2-MSC6) were further characterized. Morphology, proliferation rate of the MSC clones were similar and all clones were CD45<sup>-</sup>, CD11b<sup>-</sup>, CD29<sup>+</sup>, CD44<sup>+</sup>, CD73<sup>+</sup>, CD106<sup>+</sup>, CD119<sup>+</sup> and Sca-1<sup>+</sup> fulfilling MSC criteria. In the presence of inducing factors, MSC clones differentiated *in vitro* into osteoblasts and adipocytes. Based on histochemical staining, MSC2, MSC4 and MSC5 exhibited strong, while MSC3 and MSC6 weak osteoblast differentiation. Cytofluorimetric lipid quantification showed similar lipid accumulation in MSC clones during adipogenic differentiation. Pro-angiogenic effect of MSC clones was examined in an *in vitro* angiogenesis test where MSC clones pre-seeded with endothelial cells assembled into pre-vascular structures to a similar extent. Analysis of pro-angiogenic factor expression by qRT-PCR showed that all clones expressed similar level of angiopoietin-1 (*Angpt1*), vascular endothelial growth factor A (*Vegfa*) and galectin-1 mRNAs.

Immunomodulatory properties of MSC clones were assessed both *in vitro* and *in vivo* model systems. In *in vitro* MSC-T-cell co-culture experiments all MSC clones exhibited significant proliferation inhibition of ConA-activated T-cells. Nevertheless, the

degree of inhibition remarkably differed between the clones. Hence, proliferation of T-cells was robustly diminished in the presence of MSC2, MSC4, and MSC5 while it was poorly inhibited by MSC3 and MSC6 resulting in the following order: MSC2 $\geq$ MSC5>MSC4>MSC3 >> MSC6. To explore the background of the clonal variability, the expression levels of genes encoding immunomodulatory factors or enzymes involved in factor synthesis have been determined using qRT-PCR. Prostaglandin endoperoxide synthase 2 (*Ptgs2*) mRNA was equally high in all clones while indolamine-2,3-dioxygenase 1 (*Ido1*) mRNA were not detected in either clones. Nevertheless, mRNA encoding nitric oxide (NO) synthase 2 (*Nos2*), an enzyme responsible for generation of anti-inflammatory mediator, NO showed substantial difference between the MSC clones: it was expressed at higher levels in MSC2, MSC5 and MSC4 than in MSC3 and was undetectable in MSC6 indicating a pivotal role of NO. To verify the essential role of NO in inhibition of T-cell proliferation, NOS2 activity was blocked by a specific inhibitor, L-NMMA. This drug impeded the function of MSC2 and as it was expected, did not affect the non-inhibitory clone, MSC6 which did not expressed NOS2. Blocking PTGS2 with indometacin resulted in partial inhibition of MSC2 and no inhibition of anti-proliferative effect of MSC6.

To investigate *in vivo* immunomodulation, the effects of the most and least immunosuppressive MSC2 and MSC6 clones, respectively, were tested in ovalbumin-induced delayed type hypersensitivity (DTH) response in mice. The results obtained in the *in vivo* model supported those of *in vitro* findings as MSC2 significantly prevented, while MSC6 did not affect the hypersensitivity response.

Cell therapies, incessantly increasing in number, represent a possibility to benefit from MSCs' property of differentiation, anti-inflammatory effect. Treatment of acute graft versus host disease, which is common but severe complication after allogeneic bone marrow transplantation, is one of the most promising targets of MSC therapies besides regenerative medicine e.g. in orthopedics. During application as cell therapy, MSCs frequently get into an inflammatory environment where inflammatory cytokines, such as IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  occur abundantly. Hence, it is of special interest how the inflammatory environment affects the MSC functions.

We have shown that pre-treatment of MSC clones with IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$ , a process, called "licensing", diminishes the osteoblast differentiation and accordingly the expression of specific marker genes (*Runx2*, *Bglap*, *Spp1*). In addition, pro-inflammatory

cytokines abolished the pro-angiogenic function of MSC clones as well. Complete lack of pre-vascular structures was observed in co-cultures of MSC clones and endothelial cells.

Licensing by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  enhanced the anti-proliferative activity of MSC clones in MSC-T-cell co-cultures. This effect was the most prominent in MSC3 and MSC6 clones, which exerted poor inhibitory activity without cytokine treatment. In good agreement with triggered proliferation inhibitory effect of the MSC clones, expression of *Nos2*, *Ptgs2* and *Ido1* involved in immunosuppression by MSCs were upregulated. Specific inhibitor of NOS2, L-NMMA blocked the immunosuppressive activity supporting the important role of NO. Inhibition of production of PGE2 with indometacin and activity of IDO1 with 1-MT resulted in partial and no retardation of anti-proliferative effect of MSC clones indicating a partial or no role of PGE2 and IDO1, respectively.

*In vitro* results were validated *in vivo* DTH response. Pre-stimulation with pro-inflammatory cytokines abrogated the difference observed between unstimulated MSC2 and MSC6 since licensing MSC6 by IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  prior to injection resulted in similar effective inhibition of hypersensitivity reaction to that of MSC2.

Summary of the presented results: bone marrow MSC population is heterogeneous regarding osteogenic differentiation, pro-angiogenic properties and more explicitly immunosuppressive activity. Anti-inflammatory cytokines, IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  polarize MSC functions since they shift MSC clones from differentiation to anti-inflammatory activity. Licensing MSC clones by the above cytokines abolishes osteogenic differentiation and pro-angiogenic activity meanwhile the immunosuppressive function is remarkably elevated. Based on these results it may be reasonable to consider that licensing of MSCs prior to therapy of immunological disorders and contrarily, reduction of inflammation using anti-inflammatory drugs systemically prior to usage of MSCs in regenerative medicine could enhance the effectiveness of MSC therapy.

## XI. Köszönetnyilvánítás

Először is szeretném megköszönni témavezetőimnek, **Prof. Dr. Monostori Évának** és **Dr. Czibula Ágnesnek**, hogy megismertették velem, hogy hogyan kell tudományosan megközelíteni egy kérdést, véghez vinni a kísérleteket, kiértékelni, következtetést levonni az eredményekből. Továbbá abban is rengeteget segítettek, hogyan kell az eredményeket tudományos fórumokon előadni és belőlük tudományos cikket írni. Ezeket a tapasztalatokat nem csak a kutatói pályán, de az élet más területein is alkalmazni tudom. Köszönöm Monosnak, hogy személyével kiváló példát állított arról, hogy milyen egy jó csoportvezető, aki törődik a kollégáival és kellő szigorral segíti őket pályájukon az előrehaladásban. Ági segítségnyújtásával, gyakorlatias tanácsaival és rugalmas hozzáállásával élvezetessé varázsolta számomra a molekuláris biológiai munkát.

A csoportban eltöltött 5 év alatt értékes és kedves emberekkel dolgozhattam együtt, akik türelmesek és segítőkészek voltak velem, és amiért hálával tartozom mindegyiküknek. Szeretném megköszönni **Dr. Fajka-Boja Robertának** az *in vitro* és *in vivo* immunológiai kísérletek beállítását, tapasztalatainak átadását, valamint az áramlási citometriai adatok kiértékelésében nyújtott segítséget. **Gercsó Andrásné Andinak** nagyon hálás vagyok az MSC-k gondos fenntartásáért, növesztéséért. **Hornung Ákosnak** köszönöm a statisztikai elemzésekkel kapcsolatos észrevételeket. Szeretnék köszönetet mondani **Dr. Kriston-Pál Évának**, hogy megtanította nekem a prevascularis struktúra tesztet, egér nyirokcsomók izolálását, különböző mikroszkópok használatát és hogy segített az állatkísérletek elvégzésében. Szeretném megköszönni **Dr. Blaskó Andreának**, **Makra Ildikónak**, **Novák Juliannának** és **Dr. Szebeni Gábor Jánosnak** a vidám hangulatot.

**Dr. Uher Ferenc** számos ponton segítette a munkámat. Tanár úr izolálta az MSC-ket, rendelkezésemre bocsátott *in vitro* differenciálódási és hisztokémiai protokollokat. A vezetésével működő laborban történt az MSC-k egyes sejtfelszíni markereinek vizsgálata **Kudlik Gyöngyi** segítségével. Emellett rengeteg hasznos észrevétele, tanácsa volt a munkát illetően. Mindezekért hálás köszönettel tartozom neki és csoportjának.

**Dr. Katona Róbertnek** szeretném megköszönni a rendelkezésemre bocsátott állatokat és ellenanyagokat, **Dr. Vizler Csabának** a H5V sejtvonalat és a TNF- $\alpha$ -át. Hálás vagyok **Dr. Puskás Lászlónak** és **Dr. Zvara Ágnesnek** a q-RT-PCR kísérletekben nyújtott segítségért. Köszönöm **Fehér Nórának** és **Kotogány Editnek**, hogy segítettek az áramlási citometriás kísérletek elvégzésében.

Köszönöm **Dr. Széll Mártának** és **Dr. Vizler Csabának**, hogy elvállalták doktori dolgozatom bírálatát és hálás vagyok a gondos javításért és a hasznos észrevételekért.

Köszönöm az **SZBK Genetikai Intézetének**, hogy lehetőséget kaptam PhD munkám elvégzésére az Intézetben, és hogy részt vehettem az Intézet által számos konferencián, előadáson és egy tanulmányúton Svédországban.

Végül szeretném megköszönni **családomnak**, **páromnak** és **barátaimnak**, hogy PhD hallgatói évek alatt végig mellettem álltak és szeretetükkel támogattak.