

dc_404_12

Akadémiai doktori értekezés

**A MESENCHYMALIS ŐSSEJTEK EREDETE, SOKFÉLESÉGE ÉS
FUNKCIÓJA**

Dr. Uher Ferenc

*Országos Vérellátó Szolgálat
Őssejt-biológia*

Budapest, 2012.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	6
1. Bevezetés	10
1.1. A szöveti őssejtek	10
1.2. Mesenchymalis ős-, vagy stroma sejtek	15
1.3. A hematopoézis szabályozása – a vérképző őssejt „niche”	19
1.3.1. A Notch-jeltovábbító rendszer szerepe a vérképzés szabályozásában	24
1.3.2. Egy lektin – számos funkció	27
1.4. MSC „homing” és szövetregeneráció	29
1.5. Immunszuppresszió és gyulladásgátlás	35
1.5.1. Immunszuppresszió <i>in vitro</i>	35
1.5.2. Immunszuppresszió <i>in vivo</i>	36
1.6. A diabetes mellitus őssejtterápiája – a pancreas regenerációja	40
1.6.1. β -sejtek előállítása embrionális és szöveti őssejtekből	41
1.6.2. A Langerhans-szigetek regenerációja <i>in vivo</i>	43
1.7. A mesenchymalis őssejtek terápiás alkalmazásának lehetőségei és korlátai – kitekintés	45
2. Célkitűzések helyett – „<i>in medias res</i>”	48
3. Anyagok és módszerek	49
3.1. Kísérleti állatok	49
3.2. <i>In vitro</i> módszerek	49
3.2.1. Egér mesenchymalis stroma sejtek szeparálása és tenyésztése	49
3.2.2. Egér vérképző ős- és elődsejtek dúsítása és tenyésztése	50
3.2.3. Emberi mononukleáris sejtek és mesenchymalis stroma sejtek szeparálása és tenyésztése	50
3.2.4. A mesenchymalis őssejtek adipocytá, osteoblast, és chondrocyta irányú differenciáltatása	51
3.2.5. Kolóniaképző sejtek vizsgálata lágy-gél kultúrában	52
3.2.6. „Macskakő” kolóniát képző sejtek tenyésztése	52
3.2.7. A kemotaxis és transzendotheliális migráció vizsgálata	53

3.2.8. T-sejt proliferáció és gátlása	53
3.3. <i>In vivo</i> módszerek	54
3.3.1. Csontvelő transzplantáció	54
3.3.2. A vérképző ős- és elődsejtek mobilizációja	55
3.4. <i>Analitikai és preparatív módszerek</i>	55
3.4.1. Áramlási citometria	55
3.4.2. Rekombináns Jagged-1 fehérje és galektin-1 előállítása	56
3.4.3. Citokin szintek meghatározása	57
3.4.4. Polimeráz láncreakción alapuló módszerek	57
3.4.5. Western blot	59
3.4.6. Szövettan, immunhisztokémia és immunfluoreszcencia	59
3.4.7. Fluoreszcens <i>in situ</i> hibridizáció	60
3.5. <i>A diabetes modell</i>	61
3.5.1. A betegség indukciója és követése	61
3.5.2. Glükóz tolerancia teszt	62
3.5.3. A cukorbeteg egerek transzplantációja	62
3.6. Statisztikai analízis	62
4. Eredmények	63
4.1. <i>Különböző eredetű adherens stroma sejtek izolálása és jellemzése</i>	63
4.1.1. Az egér csontvelőből, zsírszövetből, lépéből, aorta falból és thymusból származó stroma sejtek felszíni markerei és differenciálódási képessége	63
4.1.2. Az emberi csontvelőből és zsírszövetből izolált stroma sejtek összehasonlító vizsgálata	67
Irodalom: Hegyi B et al, <i>Int Immunol</i> 22 :551. (2010); Dudics V et al, <i>Cells Tissues Organs</i> 189 :307. (2009); Horvát-Karajz K et al, <i>Lasers Surg Med</i> 41 :463. (2009); Hajdu M et al, <i>Acta Haematol</i> 109 :124. (2003); Vas V et al, <i>Haematologia</i> 32:175. (2002)	
4.2. <i>Az egér mesenchymalis őssejtpopulációk közös „genetikai ujjlenyomata”</i>	68
4.3. <i>A különböző eredetű mesenchymalis őssejtek regionális identitása és eredete</i>	72
4.3.1. A Hox-kód	72

4.3.2. Egyéb, homeodomén-tartalmú transzkripciós faktorok kifejeződése az őssejtekben	77
--	----

Irodalom: Sági B et al, *Stem Cells and Development* **21**:814. (2012); Hegyi B et al, *Int Immunol* **22**:551. (2010)

4.4. A mesenchymalis őssejtek funkciója 78

4.4.1. A hematopoézis támogatása – a vérképző őssejt „niche” kialakítása	78
4.4.1.1. A Jagged1 Notch-ligandum szerepe a vérképző ős- és elődsejtek osztódásának és differenciálódásának szabályozásában	80
4.4.1.2. A Notch-rendszer működési zavara myelodysplasiás betegekben	86
4.4.1.3. A galektin-1 szerepe a hematopoézisben és a vérképző sejtek mobilizációjában	90

Irodalom: Vas V et al, *J Leukoc Biol* **75**:714. (2004); Vas V et al, *Stem Cells* **23**:279. (2005); Kertész Zs et al, *Cell Biol Int* **30**:401. (2006); Kiss J et al, *Exp Hematol* **35**:305. (2007); Varga G et al, *Pathol Oncol Res* **13**:311. (2007)

4.4.2. Immunszuppresszió és gyulladás-gátlás	99
4.4.2.1. A mitogén és alloantigén-indukált T-sejt proliferáció gátlása <i>in vitro</i> kultúrában	99
4.4.2.2. A gyulladásos környezet szerepe a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2 termelésének szabályozásában	102
4.4.2.3. A mesenchymalis őssejtek és a mononukleáris fagocitasejtek kölcsönhatása – a macrophagok polarizációjának változása az őssejtek jelenlétében	106

Irodalom: Hegyi B et al, *Biochem Biophys Res Commun* **419**:215. (2012); Varga N et al, *Biochem Biophys Res Commun* **414**:474. (2011); Hegyi B et al, *Int Immunol* **22**:551-559. (2010)

4.4.3. Szövet regeneráció és sejttérápia - a streptozotocin-indukált diabetes őssejttérápiája	111
4.4.3.1. Az streptozotocin-indukált 1-es típusú diabetes friss csontvelősejtek és <i>in vitro</i> felszaporított	

mesenchymalis őssejtek egyidejű adásával gyógyítható	111
4.4.3.2. A kezelés egy endogén regenerációs folyamatot indít el a beteg állatokban	121
4.4.3.3. A mesenchymalis őssejtek a β -sejt specifikus T-sejt választ is gátolják kísérleti rendszerünkben	123
 Irodalom: Urbán VS et al, <i>Stem Cells</i> 26 :244-253. (2008); Hegyi B et al, <i>Int Immunol</i> 22 :551-559. (2010)	
5. Megbeszélés	126
5.1. A mesenchymalis ősz-, vagy stroma sejtek eredete és sokfélesége	126
5.2. A vérképző ősz- és elődsejtek osztódásának, differenciálódásának és mobilizációjának szabályozása	132
5.3. Immunszuppresszió és gyulladásgátlás	138
5.4. A diabetes mellitus egy lehetséges őssejtterápiája	142
6. Összefoglalás	147
Irodalom	149
Az értekezés alapjául szolgáló közlemények	173
<i>Angol nyelven</i>	173
<i>Magyar nyelven</i>	174
Köszönetnyilvánítás	176

Rövidítések jegyzéke

Ao-MSc = aorta fal eredetű MSC (14 napos állatból);
APC = antigén-bemutató sejt (antigen-presenting cell);
 α -SMA = α -simaiizom aktin (α -smooth muscle actin);
BDNF = agyi-eredetű neutrofikus faktor (brain derived neutrophic factor);
BFU-E = erythroid kolóniaképző sejt (burst-forming unit-erythroid);
BMC = csontvelői magvas sejt (nucleated bone marrow cell)
BMP = csont morfogenetikus fehérje (bone morphogenetic protein);
BMT = csontvelő transzplantáció (bone marrow transplantation);
CAFC = „macskakő” kolóniát képző sejt (cobblestone area-forming cell);
CAR sejtek = CXCL12-ben gazdag retikuláris sejtek (CXCL12-abundant reticular cells);
CFU-F = fibroblast kolóniaképző sejt (colony-forming unit fibroblast);
CFU-GEMM = granulocita-erythrocyta-megakaryocita-macrophag kolóniaképző sejt
(colony-forming unit-granulocyte, erythrocyte, megakaryocyte, macrophage);
CFU-GM = granulocita-macrophag kolóniaképző sejt (colony-forming unit-granulocyte,
macrophage);
CLP = közös lymphoid elődsejt (common lymphoid progenitor cell);
CMP = közös myeloid elődsejt (common myeloid progenitor cell);
ConA = concanavalin A;
COX = ciklooxigenáz enzim;
CsA = cyclosporin A;
Cux1 = cut-like homeobox 1 gén;
Cy = ciklofoszfamid;
Cs-MSc = csontvelői MSC (felnőtt – 10-12 hetes - állatból);
DAPI = diamidino-2-phenylindol;
DC = dendritikus sejt (dendritic cell);
Dlx1 = distal-less homeobox 1 gén;
DM = diabetes mellitus;
DMEM = Dulbecco által módosított Eagle-féle médium (Dulbecco's Modified Eagle
Media);
EAE = kísérletes autoimmun encephalomyelitis (experimental autoimmune
encephalomyelitis);
EGF = epidermalis növekedési faktor (epidermal growth factor);

EGFP = fokozottan világító zöld fluoreszkáló fehérje (enhanced green fluorescent proteine);

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

En2 = engrailed homeobox 2 gén;

FCS = foetalis borjúsavó (foetal calf sera);

FCs-MSc = csontvelői MSC (14 napos állatból);

FGF = fibroblast növekedési faktor (fibroblast growth factor);

FISH = fluoreszcens *in situ* hibridizáció (fluorescent *in situ* hybridization);

FITC = fluoreszcein-izotiocianát;

FL = Flk-2/Flt-3 ligandum;

Gal-1 = galektin-1;

G-CSF = granulocita kolónia-stimuláló faktor (granulocyte colony stimulating factor);

GDF = növekedési és differenciálódási faktor (growth differentiation factor);

GFP = zöld fluoreszkáló fehérje (green fluorescent protein);

GM-CSF = granulocita-macrophag kolónia-stimuláló faktor (granulocyte macrophage colony stimulating factor);

GMP = granulocita-macrophag elődsejt (granulocyte-macrophag progenitor cell);

GVHD = graft versus host betegség (graft versus host disease);

HBSS = Hanks-féle oldat (Hanks' Balanced Salt Solution);

HE = Hematoxylin–eosin;

HGF = hepatocita növekedési faktor (hepatocyte growth factor);

Hh = sündisznó (Hedgehog);

Hox gének = homeotikus szelektor (homeotic selector) gének;

HSC = hematopoetikus őssejt (hematopoietic stem cell);

IBMX = 3-izobutil-1-metilxanthin;

ICAM-1 = intracelluláris adhézións molekula 1 (intracellular adhesion molecule);

IDO = indolamin-2,3-dioxigenáz enzim;

IGF-1 = inzulin-szerű növekedési faktor 1 (insulin-like growth factor 1);

IFN- γ = interferon gamma;

IL = interleukin;

Indo = indometacin;

IPS = indukált pluripotens sejt;

Lin⁻ = vérsejtfajlódási sorokra jellemző markerekre negatív (lineage negative);

LMPP = lympho-myeloid multipotens elődsejt (lymphoid-primed multipotential progenitors);

LNGFR = kis affinitású idegnövekedési faktor receptor (low-affinity nerve growth factor receptor, vagy p75);

L-NMA = N-metil-L-arginin-acetát;

Lp-MSc = lép eredetű MSC (14 napos állatból);

LTRA = tartós repopulációra képes (long-term repopulating ability) vérképző őssejtek;

MCAM = melanoma sejt adhézións molekula (melanoma cell adhesion molecule);

MCP-1 = monocita kemotaktikus fehérje 1 (monocyte chemoattractant protein 1);

M-CSF = macrophag kolónia-stimuláló faktor (macrophage colony stimulating factor);

MDS = myelodysplasia;

MEP = megakaryocita-erythrocyta elődsejt (megakaryocyte-erythroid progenitor cell);

MHC = fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex);

Mkx = mohawk homeobox gén;

MLR = kevert lymphocita kultúra (mixed lymphocyte culture);

MNC = mononukleáris sejtek (mononuclear cell);

MPP = multipotens elődsejt (multipotent progenitor cell);

MSC = mesenchymalis ő-, vagy stroma sejt (mesenchymal stem/stromal cell);

1-MT = metil-triptofán;

MΦ = macrophag;

NOD/SCID egér = elhízással nem járó diabetesben (non-obese diabetic) és súlyos kombinált immundeficiencia szindrómában (severe combined immunodeficiency) szenvedő egér;

NOS = nitrogén-oxid-szintáz enzim;

OA = osteoarthritis;

OVA = ovalbumin;

PBS = foszfáttal-pufferelt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline);

PCR = polimeráz láncreakció (polymerase chain reaction);

PDGF = vérlemezke eredetű növekedési faktor (platelet-derived growth factor)

PE = fikoeritrin;

PGE2 = prosztaglandin E2;

PI = propídium jodid;

PIGF = placenta-eredetű növekedési faktor (placental growth factor);

Pitx1 = paired-like homeodomain transcription factor 1 gén;

RA = rheumatoid arthritis;

Sca-1 = őssejt-antigén-1 (stem cell antigen 1);

SCF = őssejt-faktor (stem cell factor);

SDF-1 = stroma-eredetű faktor 1 (stromal derived factor 1), vagy CXCL12;

Six4 = *sine oculis-related homeobox 4* gén;

sJG1^{ECD} = szolublis Jagged-1 fehérje extracelluláris része;

STRA = átmeneti repopulációra képes (short-term repopulating ability) vérképző őssejtek;

STZ = streptozotocin;

SVF = stroma vasculáris frakció (stroma vascular fraction);

TBI = egésztest besugárzás (total body irradiation);

Tbx5 = *T-box 5* (Brachyury) gén;

TGF- β = transzformáló növekedési faktor β (transforming growth factor beta);

Th-MSC = thymus eredetű MSC (14 napos állatból);

Tlx1 = T-cell leukemia homeobox 1 gén;

TNF- α = tumor-nekrózis faktor alfa (tumor necrosis factor alpha);

TPO = trombopoietin;

Treg = regulátor T-sejt;

VCAM-1 = vaszkuláris sejt adhéziós molekula 1 (vascular cell adhesion molecule 1);

VEGF-A = vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A (vascular endothelial growth factor);

Wnt = a „szárny nélküli” és az „integrációs hely” angol megfelelőiből képzett mozaikszó
(Wingless (Wg)/Integration (Int);

Zs-MSC = zsírszövet eredetű MSC (felnőtt állatból);

„Korunk sok ismeretet kíván, s ez jó oldalai közé tartozik; de sok ismeret után kapkodás könnyen oda viszen, hogy címmel és színnel elégedjünk meg; s e hibára hajlás a kor rossz oldalai közt talán a legrosszabb.”

Kölcsey Ferenc: *Parainesis* (1834?)

1. Bevezetés

Össejtnek nevezünk minden olyan klonogén sejtet, amely önfenntartásra és egy vagy több differenciálódott sejttypus, illetve sejtfejlődési sor létrehozására képes. Az össejtek – legalábbis populációs szinten – változatlan formában történő fenntartását és egyidejű differenciálódását aszimmetrikus sejtosztódás(ok) biztosítják. (Az össejt - „Stammzelle” – kifejezést először Ernst Haeckel használta; Haeckel E: *Natürliche Schöpfungsgeschichte*, Berlin, Georg Reimer, 1868). A megtermékenyített petesejt, a zigóta első leánysejtjei (a blastomérák) totipotens össejtek, belőlük az intra- és az extraembrionális szövetek (embriótest és embrionális burkok) egyaránt kialakulhatnak. A beágyazódás előtti blastocysta belső sejtömegéből (embrioblast) izolálható embrionális össejtek (ES sejtek, illetve sejtvonalak) pluripotensek, tehát az embriótest minden – ecto-, endo-, és mesodermális eredetű - szöve és szerve kifejlődhet belőlük, de extraembrionális szövetek létrehozására már nem képesek. A felnőtt szervezetben található szöveti össejtek differenciálódási képessége még korlátozottabb, általában csak a nekik otthont adó szövet jellemző sejttypusait tudják létrehozni, azaz multipotensek. Fiziológias körülmények között ezek az össejtek biztosítják az adott szövet folyamatos megújulását, pótolják az elpusztult testi sejteket, sérülés esetén pedig részt vesznek az érintett szerv regenerációjában (Eckfeldt CE et al, 2005; Slack JMW, 2008).

1.1. A szöveti össejtek

Egy-egy szöveti össejtnak nagyon sokféle döntést kell hoznia a szervezetben. Az első és legfontosabb, hogy életben maradjon-e (szükség van-e rá) vagy elpusztuljon? Ha életben marad, milyen életutat válasszon? Oszródás vagy differenciálódás, helyben maradás vagy elvándorlás? Mi legyen az osztódás során keletkező leánysejtek sorsa? Továbbéljenek-e a fejlődésben (differenciálódás), vagy őrizzék meg a „fiatalságukat” (önfenntartás)? A döntéseket az össejtek hozzák, de mindenképpen meg kell felelniük az adott szövet és az egész szervezet igényeinek - biztosítaniuk kell a homeosztázis fenntartását (1. ábra). Ez az igény - legalábbis mennyiségileg - nagyon eltérő feladatokat ró a különböző szöveti össejtpopulációkra. A folyamatosan megújuló szövetek, például a vér

fiziológiás működése naponta néhányszor 10^{11} új vörösvérsejtet és granulocytát igényel. Ráadásul a vérképző őssejteknek (HSC) a szervezetet érő stresszhelyzetekre - fertőzés, sérülés, tartós oxigénhiány stb. - is rugalmasan kell reagálniuk, növelve (vagy néha csökkentve) az érett vérsejtek számát a keringésben (Doulatov S et al. 2012). Ugyanakkor - és ez a másik véglet - a központi idegrendszerben található idegi őssejtek fiziológiás körülmények között szinte észrevehetetlenek. Felnőtt korban új idegsejtek csak kis számban, és valószínűleg csak az agy bizonyos területein - például a subventriculáris zónában (SVZ) és a hippocampus subgranuláris zónájában (SGZ) (Ming GL and Song H, 2011) keletkeznek.

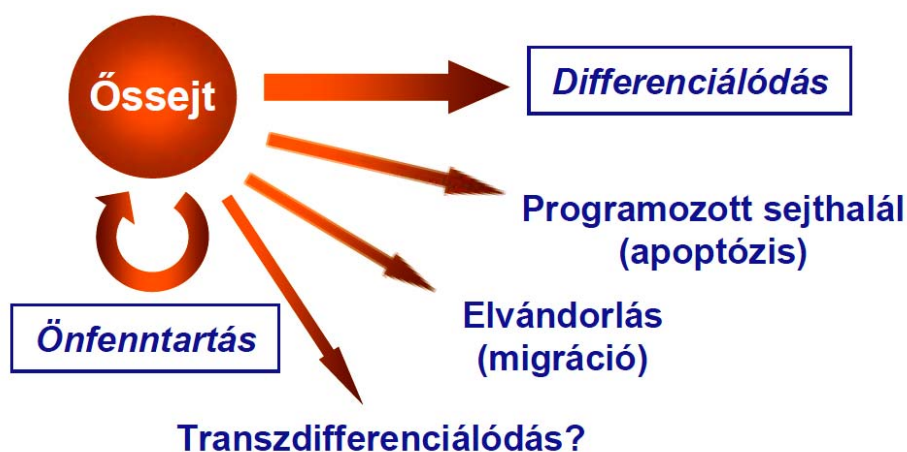
A fentiek alapján az őssejtbiológia kulcskérdése: hogyan választ magának „életpályát” egy őssejt úgy, hogy közben - legalábbis a populáció szintjén – önfenntartó képességét is megőrizze? A válasz részben az őssejtek genomjának működésében, részben a sejtek mikrokörnyezetében („*niche*”) keresendő. A 2000-es évek elején még úgy gondoltuk, hogy a több tízezer gén kifejeződésének egyidejű meghatározására alkalmas „DNS-chip” technika segítségével hamarosan sikerül azonosítani az őssejt létet meghatározó néhány tucat, esetleg néhány száz gént. Azaz találunk egy olyan, viszonylag egyszerű „genetikai ujjlenyomatot”, ami a legkülönbözőbb őssejtek esetén biztosítja az őssejt-populáció változatlan formában történő fenntartását, és – egyidejűleg – különböző sejtfajlódási sorok irányába történő differenciálódásukat, azaz plaszticitásukat. Sikerült is mintegy kétszáz-kétszázötven olyan DNS-szekvenciát azonosítani, amelyek többféle (embrionális, vérképző és idegi) őssejtben egyaránt kifejeződnek (Fortunel NO et al, 2003). Valamilyen „őssejt-program” tehát valószínűleg létezik. A szöveti őssejtek legfőbb „titka” azonban valami egészen más. Különleges képességeik elsősorban epigenetikai állapotukra – a génkifejeződés szabályozására - vezethetők vissza. Örökítő anyaguk, vagyis a különböző – elsősorban hiszton – fehérjékkel komplexet képező DNS-ük ugyanis a testi sejtekéhez képest rendkívül laza szerkezetű, azaz nyitott. Így az őssejtekben még jóval több gén hozzáférhető a hírvivő RNS (mRNS) molekulák átírását végző apparátus számára, mint a véglegesen differenciálódott sejtekben. Ezért számos különböző – más-más fejlődési irány, illetve sejtfajlódási sor meghatározására képes, ún. mester „transzkripció faktort” kódoló gént tudnak egyidejűleg kifejezni. Potenciálisan tehát egy szöveti őssejt sokféle genetikai program megvalósítására képes. A jelenséget „genetikai promiskuitásnak” is nevezik (2. ábra) (Hu M et al, 1997; Collas P, 2009). A döntés, hogy e lehetőségek közül adott esetben melyik realizálódik – azaz milyen irányba kezd differenciálódni a sejt – részben valószínűségi alapon, részben környezeti tényezők

hatására történik. A valószínűség szerepét legkönnyebben a Waddington-féle „epigenetikus tájkép” (3. ábra) (Waddington, CH, 1957) hasonlat segítségével érthetjük meg, ami az össejtben kifejeződő gének bonyolult hálózatát szemlélteti. Ha egy hegycsúcsról legurítunk egy golyót, az számos kisebb-nagyobb völgy felé gurulhat, útját azonban igen nehéz kiszámítani. A legvalószínűbb, hogy a legmélyebb völgy felé veszi az irányt, de ettől nagyon sok, akár egészen apró tényező – például egy útjába kerülő kavics – is eltérítheti. Ráadásul a völgyek elágazhatnak, szakadéokban vagy újabb emelkedőben is végződhetnek. Ugyanígy sohasem tudjuk biztosan megmondani, hogy egy differenciálódásnak indult össejtben végül is milyen gén – és ennek megfelelő fehérje – kombináció, azaz milyen fenotípus stabilizálódik. A szöveti össejtek közvetlen környezetéből (a „niche”-ből) érkező jelzések azonban alaposan megváltoztatják a játékszabályokat. Igyekeznek az „össejtgolyót” egy vagy néhány kiválasztott völgy, azaz meghatározott sejtfejlődési sor irányába terelni. Ezeket a jelzéseket az össejt feldolgozza, integrálja, majd meghozza a lehetséges döntés(ek)e)t. Az egyik, aszimmetrikus osztódással létrejött, vagy mindkét, szimmetrikus osztódással létrejött leánysejtje elkötelezetté válik, és ennek megfelelően kezd differenciálódni (Halley JD et al., 2008; Mohn F and Schübeler D, 2009) azaz legurulni az epigenetikai tájkép valamelyik völgyébe. A közvetlen mikrokörnyezetnek – a „niche”-nek – tehát meghatározó szerepe van a szöveti össejtek sorsának alakulásában. Az össejt számára ez a niche maga az „Édenkert” (Watt FM and Hogan B, 2000), innen kiszakítva rövid idő – általában néhány nap - alatt elveszíti önfenntartó képességét, azaz megszűnik össejtként funkcionálni.

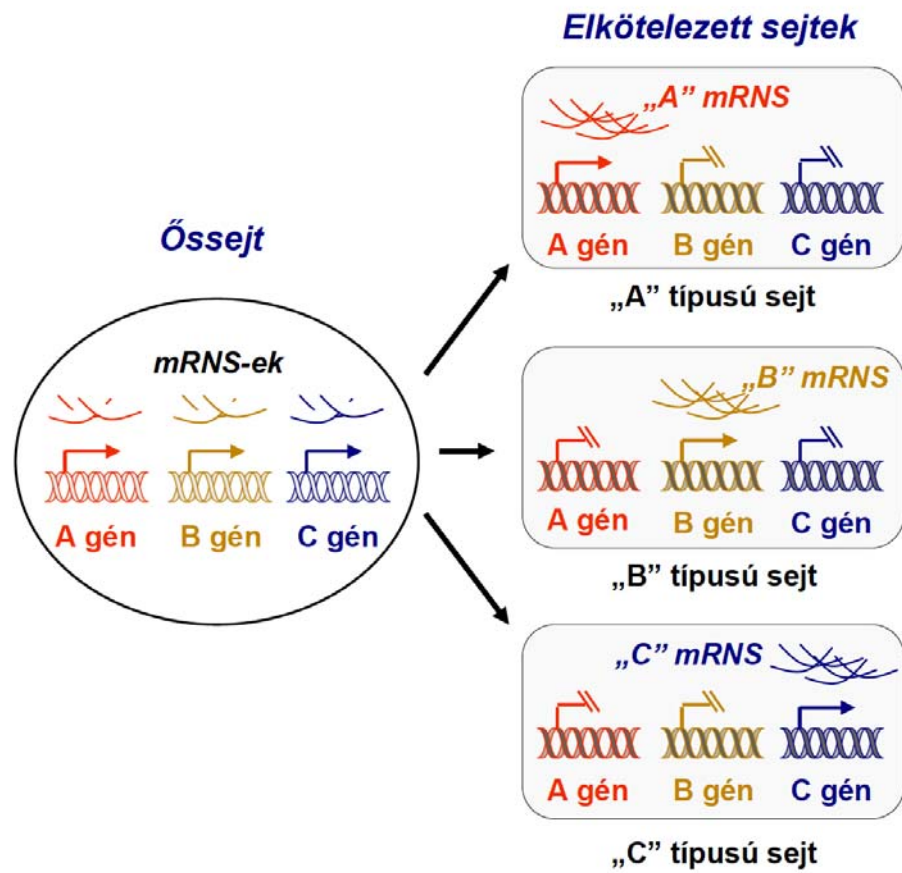
Az össejt-niche koncepciója közel harminc évvel ezelőtt a hematológiában alakult ki (Schofield R, 1983). Létrehozásában az össejttel közvetlen kapcsolatba kerülő sejtek, az általuk termelt szolubilis mediátorok és az extracelluláris mátrix egyaránt szerepet játszanak. A „niche”-t alkotó, elsősorban mesenchymalis és endothel sejtek részben közvetlen sejt-sejt kölcsönhatások, részben parakrin faktorok révén befolyásolják az össejtek működését. Kiemelkedő szerepet játszanak ebben a folyamatban a Notch jelátviteli rendszer elemei, valamint a különböző morfogén családok tagjai. A morfogének pleiotróp hatású fehérjék. Különböző kombinációkban más-más fejlődési programokat képesek aktiválni a fogékony, azaz a megfelelő receptorokat hordozó sejtekben. Az evolúció során erősen konzerválódott és a különböző össejt *niche*-ekben is kulcsszerepet játszó öt morfogén család a Wingless/Integration (Wnt), a Hedgehog (Hh), a csont morfogenetikus fehérje/transzformáló növekedési faktor- β (BMP/TGF β), az epidermalis növekedési faktor (EGF) és a fibroblast növekedési faktor (FGF) család. Míg a

Notch-rendszer és a morfogének elsősorban az őssejtek sorsát, illetve fejlődési irányát szabják meg, addig a sejtek fokozott osztódásra készítése és sejthalál (apoptózis) elleni védelme elsősorban a - szintén a *niche*-t alkotó sejtek által termelt - növekedési faktorok feladata. Ezek gyakran csak az extracelluláris mátrixhoz kötött, azaz multivalens formában igazán aktívak. Ráadásul az extracelluláris mátrix komponensek maguk is ligandumai számos sejtdhéziós molekulának, amelyek nagy számban fordulnak elő az őssejtek felszínén. A legfontosabbak közülük az integrinek, amelyeknek a szerepe nem merül ki az őssejtek helyhez kötésével, hiszen jelzéseket is eljuttatnak a sejtek belsejébe, amelyek végül számos különböző - például növekedési faktor receptorokat kódoló - gén kifejeződését befolyásolhatják (Morrison SJ and Spradling AC, 2008).

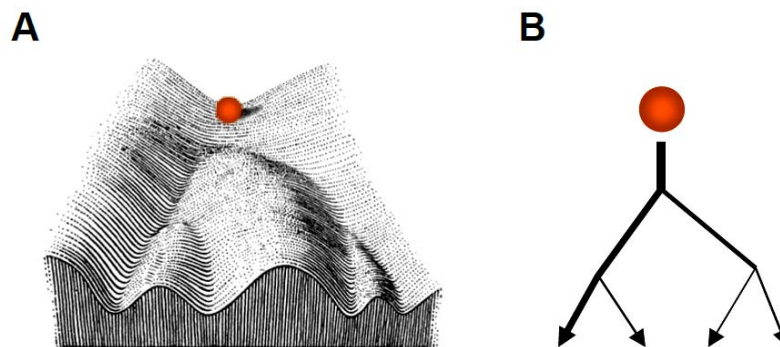
Ez a komplex és adaptív szabályozó rendszer – amelyben viszonylag kis változások is több száz vagy inkább ezer gén kifejeződését érinthetik – biztosítja a szöveti őssejtek rendkívüli plaszticitását. Ez teszi lehetővé, hogy az őssejtek mindkét alapvető feladatuknak megfeleljenek. Fiziológiás körülmények között fenntartsák az adott szövet homeosztázisát, vagyis pótolják az öregedő, pusztuló sejteket, illetve sérülés esetén biztosítják az érintett szövet regenerációját. Ugyanakkor a rendszerben fellépő minimális hiba is komoly patológiás következményekkel járhat.



1. ábra. **Amit egy szöveti őssejtnek tudnia kell.** A részletes magyarázatot lásd a szövegben.



2. ábra. A genetikai promiszkuitás vázlatos ábrázolása. A részletes magyarázatot lásd a szövegben.



3. ábra. (A) Az „epigenetikus tájkép” Conrad Hal Waddington (1957) nyomán. (B) A golyó útja – azaz a differenciálódás valószínű iránya – a tájképbe illesztve.

1.2. Mesenchymalis ősz-, vagy stroma sejtek

A mesenchymalis ősz-, vagy stroma sejtek (MSC) multipotens szöveti őssejtek, amelyek viszonylag könnyen izolálhatók, *in vitro* kultúrában jól szaporíthatók és rendkívül plasztikusak. Elsőként Friedenstein és mtsai (Friedenstein AJ et al, 1976) írták le őket, mint a csontvelőben található, *in vitro* kultúrában a tenyésztőedény falához tapadva növekedő (azaz adherens), fibroblast-szerű morfológiát mutató kolóniaképző sejteket, amelyeket CFU-F-nek (= colony-forming unit fibroblast) neveztek el. Megállapították, hogy ezek a kolóniaképző sejtek megfelelő induktorok hatására mind csont, mind porc irányba képesek differenciálódni, és a bőr alá oltva is olyan speciális mikrokörnyezetet (ektopikus csontot) tudnak kialakítani, amely biztosítja a vérképző ősz- és elődsejtek fejlődéséhez szükséges minimális feltételeket (Pittenger MF et al, 1999). A mesenchymalis őssejt elnevezést Caplan (Caplan AI, 1991) javasolta 1991-ben. Mára az is kiderült, hogy MSC-k nem csak a csontvelőben találhatók. Gyakorlatilag minden eddig vizsgált szövetünkben, szervünkben előfordulnak (da Silva Meirelles L et al, 2006; Beltrami A P et al, 2007). Emberben például a csontvelőnél jóval könnyebben hozzáférhető forrásuk lehet a zsírszövet (Zuk P et al, 2001) vagy a köldökzsinór (Wharton-kocsonya) (Erices A et al, 2000).

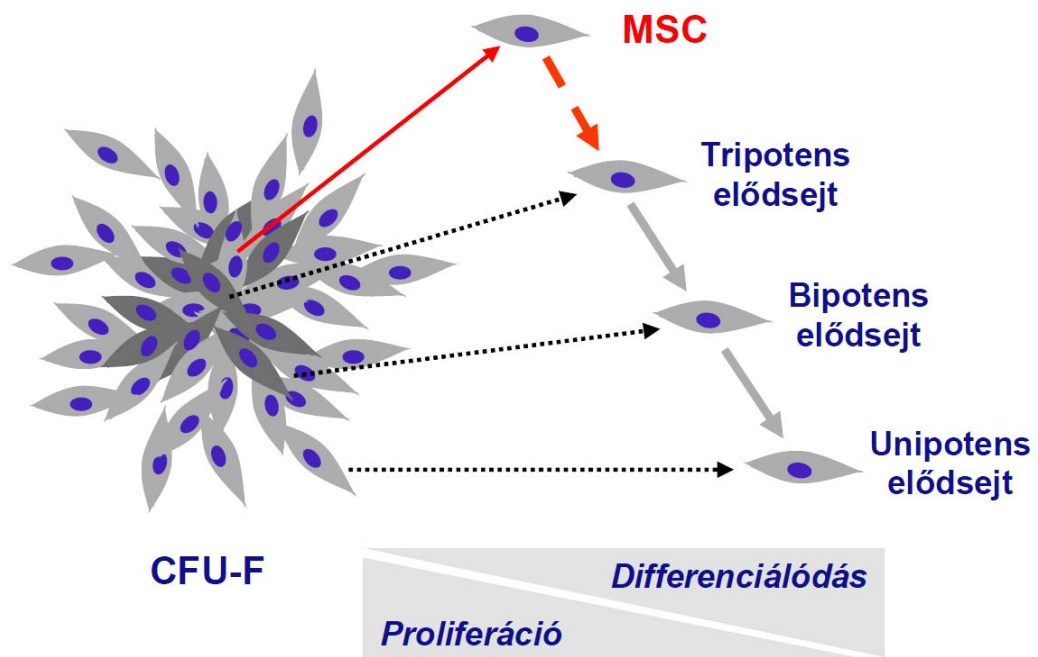
Izolálásuk specifikus – csak az MSC-k felszínén előforduló – marker(ek) hiányában (1. táblázat) (da Silva Meirelles L et al, 2008; Chamberlain G et al, 2007) ma is jórészt adherenciájukon alapul. A csontvelőből, vagy kollagenáz enzimmel emésztett egyéb szövetmintákból kitapasztott stroma sejtek többszöri átoltás után egy morfológiailag többé-kevésbé homogénnek tűnő, exponenciálisan növekedő sejtenyészetet alkotnak, amelyet – ha már nem tartalmaz vérképző elemeket – mesenchymalis sejtkultúrának tekinthetünk. Mivel az ilyen tenyészetekben a sejtosztódással egyidejűleg mindig történik spontán differenciálódás is, valójában mindig egy heterogén, MSC-kból és a belőlük képződött, különböző mértékben elkötelezett - tri-, bi- és unipotens - elődsejtek keverékéből álló sejtkultúráról beszélhetünk (4. ábra) (Baksh D et al, 2004). Igen nehéz tehát pontosan meghatározni, hogy milyen sejteket nevezzünk/nevezhetünk MSC-knek, és hogyan tudjuk egyértelműen megkülönböztetni őket a belőlük származó fibroblastoktól, myofibroblastoktól, vagy akár a pericytáktól (da Silva Meirelles L et al, 2008). Ezért 2006-ban az ISCT (= International Society for Cellular Therapy) a következő javaslatot tette: nevezzük mesenchymalis ősz-, vagy helyesebben stromasejteknek (tekintettel a mesenchymalis sejtenyészetek fent említett heterogén voltára) mindazokat a sejteket, amelyek:

- a tenyésztőedény aljához kitapadva növekednek (adherensek) és fibroblast-szerű morfológiát mutatnak;
- CD44, CD73, CD90 és CD105 pozitívok, de nem hordoznak semmilyen, vérképző őse- és elődsejtekre, a különböző vérsejtfejlődési sorokra, illetve az endothel sejtekre jellemző felszíni markereket (azaz CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, és CD31 negatívak), valamint
- csont-, porc- és zsírsejttekké egyaránt képesek differenciálódni *in vitro* (Dominici M et al, 2007).

1. táblázat. A humán és egér mesenchymalis őssejtek legfontosabb sejtfelszíni markerei

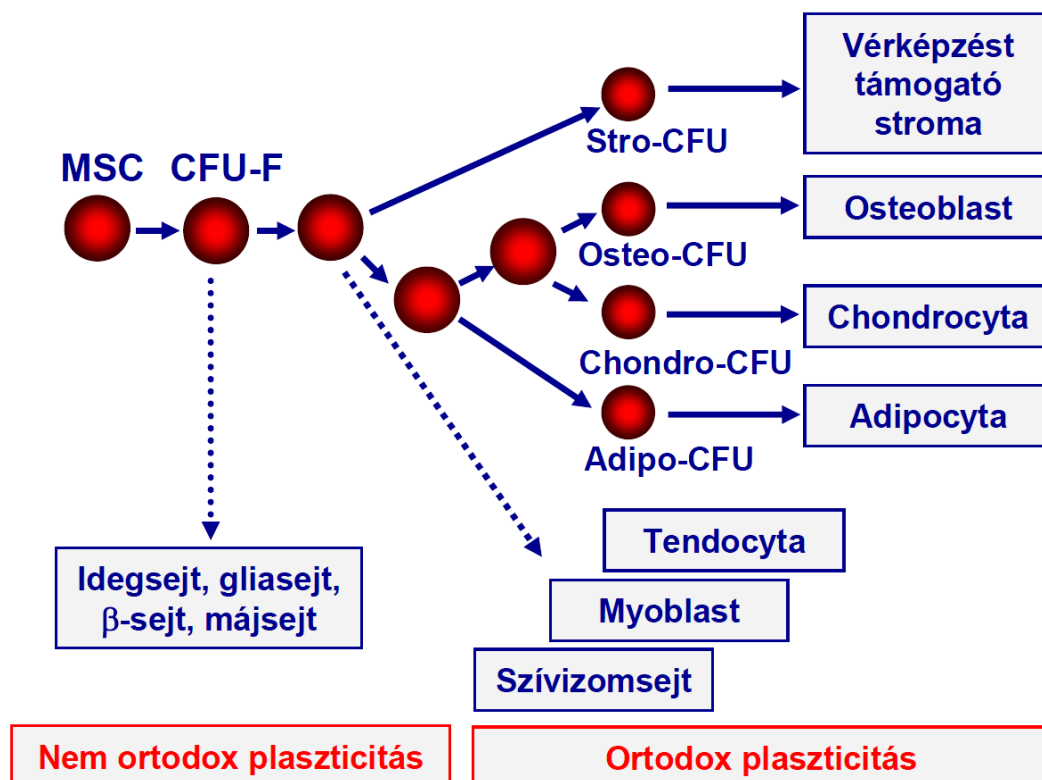
Marker	Ember	Egér
CD10 (CALLA)	-	+/-
CD11b ($\alpha_M\beta_2$, Mac-1, C3 complement receptor)	-	-
CD13 (aminopeptidáz N)	+	+/-
CD29 (β_1 integrin-lánc)	++	++
CD31 (PECAM-1)	-	-
CD34 (HPCA1)	-	-
CD44 (hyaluronate receptor)	++	++
CD45 (LCA, T200, B220, Ly5)	-	-
CD73 (ekto-5'-nukleotidáz)	++	++
CD90 (Thy-1)	++	+/-
CD105 (endoglin)	++	+
CD106 (VCAM-1)	++	+
CD117 (c- Kit)	+/-	-
CD146 (MCAM)	++	++
CD271 (LNGFR)	++	++
Stro-1 (stroma sejt antigén-1)	++	-
Sca-1 (őssejt-antigén-1)	-	++
Flk-1 (vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor 2, KDR, CD309)	+/-	-

(+) pozitív, (-) negatív, (+/-) ellentmondó adatok.



4. ábra. Egy stroma sejt tenyészet heterogenitása

Az emberi MSC-k – más szöveti őssejtekhez hasonlóan - nem halhatatlanok. Bár sok millió utódsejtet képesek létrehozni *in vitro*, az osztódások során öregsznek is, plaszticitásuk fokozatosan csökken, és végül szeneszcenssé válnak. Amíg plasztikusak, addig elsősorban különböző mesodermális eredetű sejtekké/szövetekké (myelosupportív stroma, csont, porc, zsírszövet, inak, simaizom) képesek differenciálódni (Pittenger MF et al, 1999), de speciális tenyésztési feltételek mellett talán ecto- (neuron, glia) és endodermális (β -sejtek, hepatocyták) irányú differenciálódásra is kényszeríthetők. Ez utóbbi, ún. nem-ortodox plaszticitás lehetősége – és különösen *in vivo* jelentősége - erősen vitatott (5. ábra) (Bianco P et al, 2008). Az egér MSC-k viszont – humán megfelelőiktől eltérően - spontán immortalizálódnak *in vitro* kultúrában. Átlagosan 15-20 átoltás után azonban az ő plaszticitásuk is csökken (da Silva Meirelles L et al, 2003; Peister A et al, 2004), 40-50 átoltás után pedig neoplasztikussá válnak (Tolar J et al, 2007).



5. ábra. A mesenchymalis őssejtek plaszticitása

Az adherenciájuk alapján izolált és sorozatos átoltásokkal *in vitro* kultúrában fenntartott MSC-k sajátosságai természetesen jelentősen eltérhetnek attól, amire ezek a sejtek valójában képesek *in situ*. Ezért komoly erőfeszítések történtek, hogy egy vagy néhány sejtfelszíni marker és különböző *in vivo* jelölési technikák segítségével legalább a csontvelőben azonosítsák, ill. amennyiben lehetséges, primer sejt kultúrában is jellemezzék őket. Ennek érdekében Aslan és mtsai (Aslan H et al, 2006) friss emberi csontvelőből izolálták a $CD105^{+}$ sejteket és megállapították, hogy ez a magas CFU-F aktivitást mutató sejtfrakció jórészt osteoblast, adipocyta és chondrocyta irányba egyaránt differenciálóni képes, adherens sejtekből áll. Mások a csontvelői magvas sejtek $CD271^{+}CD45^{-}$ frakciójában vélték megtalálni az MSC-eket (Jones EA et al, 2002). Kiderült ugyanis, hogy ezek a sejtek jóval magasabb transzkripciós aktivitást mutatnak, mint sejtenyészetben nevelt társaik, vagy a bőr eredetű fibroblastok. A különbség főként az osteogenezisben szerepet játszó és a Wnt családba tartozó gének esetében volt jelentős (Churchman SM et al, 2012). Ráadásul a CFU-F aktivitás is a $CD271^{+}CD45^{-}$ frakcióban koncentrált. *In*

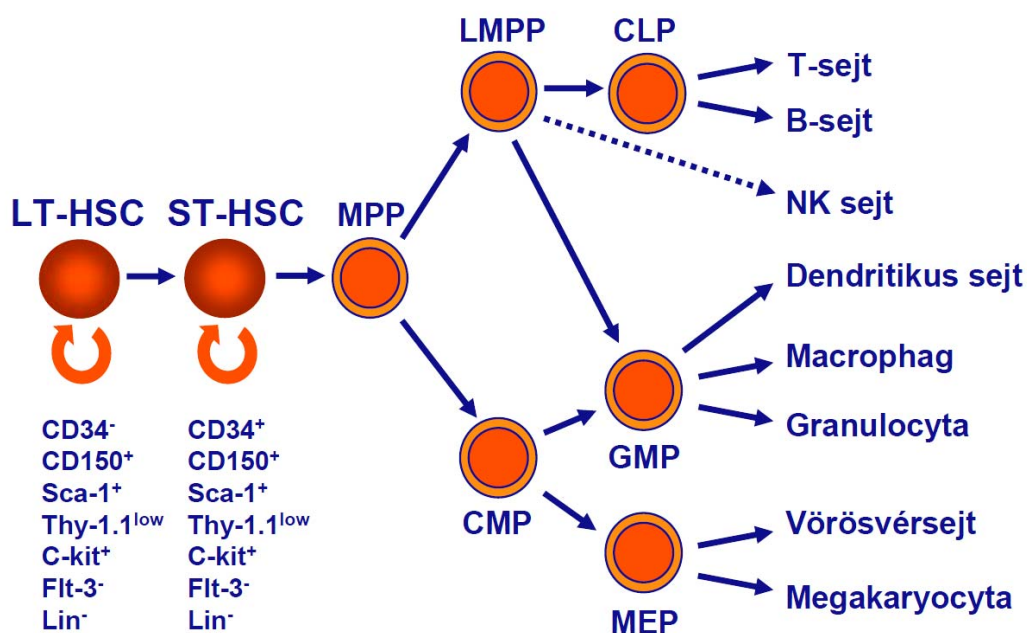
vivo – immundeficiens egerekbe oltva - pedig komplett hematopoetikus mikrokörnyezetet tudtak létrehozni a kis affinitású idegnövekedési faktor receptort (LNGRF) hordozó, CD45⁻ sejtek transzplantációjával (Tormin et al, 2011). Ugyanakkor Sacchetti és mtsai (Sacchetti B et al, 2007) a friss emberi csontvelőből mágneses gyöngyök segítségével izolált CD146⁺CD45⁻ sejtekből tudtak hematopoézist támogató csontkezdeményeket létrehozni *in vivo*. Egér csontvelői stroma sejtek egy kis, nesztint kifejező populációjából sikerült *in vitro* kultúrában klonogén, önfenntartó osztódásokra, valamint osteoblast, adipocytá és chondrocyta irányú differenciálódásra képes sejteket izolálni (Méndez-Ferrer S et al, 2010). Ezek a nesztin⁺ sejtek *in vivo* képesek voltak pótolni a rövid életű osteoblastokat, fenntartani a csont homeosztázist, és a sérülés helyére vándorolva pótolni a sérült csontokat (Park D et al, 2012). *In vivo* differenciálódási képességük azonban jóval korlátozottabb volt, mint *in vitro* plaszticitásuk. Jórészt a nesztin⁺, a CD146⁺ és a CD271⁺ stroma sejtek *in situ* lokalizációján alapul az a - ma többé-kevésbé általánosan elfogadott - feltételezés, hogy az MSC-k *in vivo* perivaszkuláris elhelyezkedésűek, „nich”-ük az erek – elsősorban a kapillárisok és kisebb artériák – falában található (Shi S and Gronthos S, 2003; Sacchetti B et al, 2007). Néhányan egyenesen a pericytákkal, vagy legalábbis azok egy részével azonosítják a mesenchymalis őssejteket (da Silva Meirelles L et al, 2008). Hangsúlyozni kell azonban, hogy igazán meggyőző bizonyíték sem az MSC-k identitására, sem anatómiai lokalizációjukra nincs. Lehetséges, hogy a fent leírt - CD146⁺, illetve nesztin⁺ - sejtpopulációk is csak MSC eredetű, de már többé-kevésbé elkötelezett elődsejtek (ld: az 1.3.-ban).

1.3. A hematopoézis szabályozása – a vérképző őssejt „niche”

A legjobban ismert, csontvelői eredetű MSC-k elsődleges funkciója a vérképzés támogatása. A vérképző rendszer egy olyan – születés után a csontvelőben elhelyezkedő - sejtmegújulási rendszer, amelyben a sejtszám állandóságának fenntartásához a rövid életű, érett sejtek pusztulásának és pótlásának szigorú egyensúlyára van szükség. A rendszer alapját a HSC-k képezik. A tartós, *in vivo* lympho-hematopoetikus repopulációra képes, definitív vérképző őssejtek (LTRA HSC) a felnőtt szervezetben általában viszonylag ritkán, és akkor is többnyire aszimmetrikusan osztódnak. Egyik leánysejtjük nem differenciálódik, tehát az őssejt kompartment fenntartásában vesz részt, másik leánysejtjükből átmeneti repopulációra képes, részben még önfenntartó őssejtek (STRA HSC), majd multipotens elődsejtek (MPP) keletkeznek. Bizonyos esetekben előfordulhat szimmetrikus osztódás is. Így a csontvelő károsodása és regenerációja során, például

csontvelő-transzplantáció után, az LTRA HSC-k szimmetrikus, önfenntartó osztódásokra is képesek, ilyenkor minden őssejt két újabb őssejtet hoz létre. A multipotens elődsejtek már gyorsan osztódnak (az ún. expanziós kompartmentbe tartoznak) és – legalábbis a vérképzés hagyományos modellje szerint - lymphoid vagy myeloid irányba elkötelezett elődsejteket (CLP, ill. CMP) hoznak létre. Előbbiekből alakulnak ki a T-, B- és NK-sejtek prekursorai, amelyek a csontvelőből a perifériás nyirokszervekbe vándorolnak. Utóbbiakból pedig a granulocyta-macrophag elődsejtek (GMP) – a kétféle fagocitasejt-fejlődési sor prekursorai – és a megakaryocyta-vörösvérsejt progenitorok (MEP) keletkeznek (Domen J and Weissman IL, 1999; Orkin SH and Zon LI, 2008). Erősen leegyszerűsítve tehát a vérképző rendszer három nagy részből áll: őssejt kompartmentből, amelyben a megtartás, expanziós kompartmentből, ahol a megsokszorozódás, és érő kompartmentből, amelyben a differenciálódás dominál. Minden vérsejt végighalad e három kompartmenten, miközben differenciálódási képessége folyamatos szűkül, azaz egyre elkötelezettebbé válik valamelyik vérsejtfejlődési sor irányába.

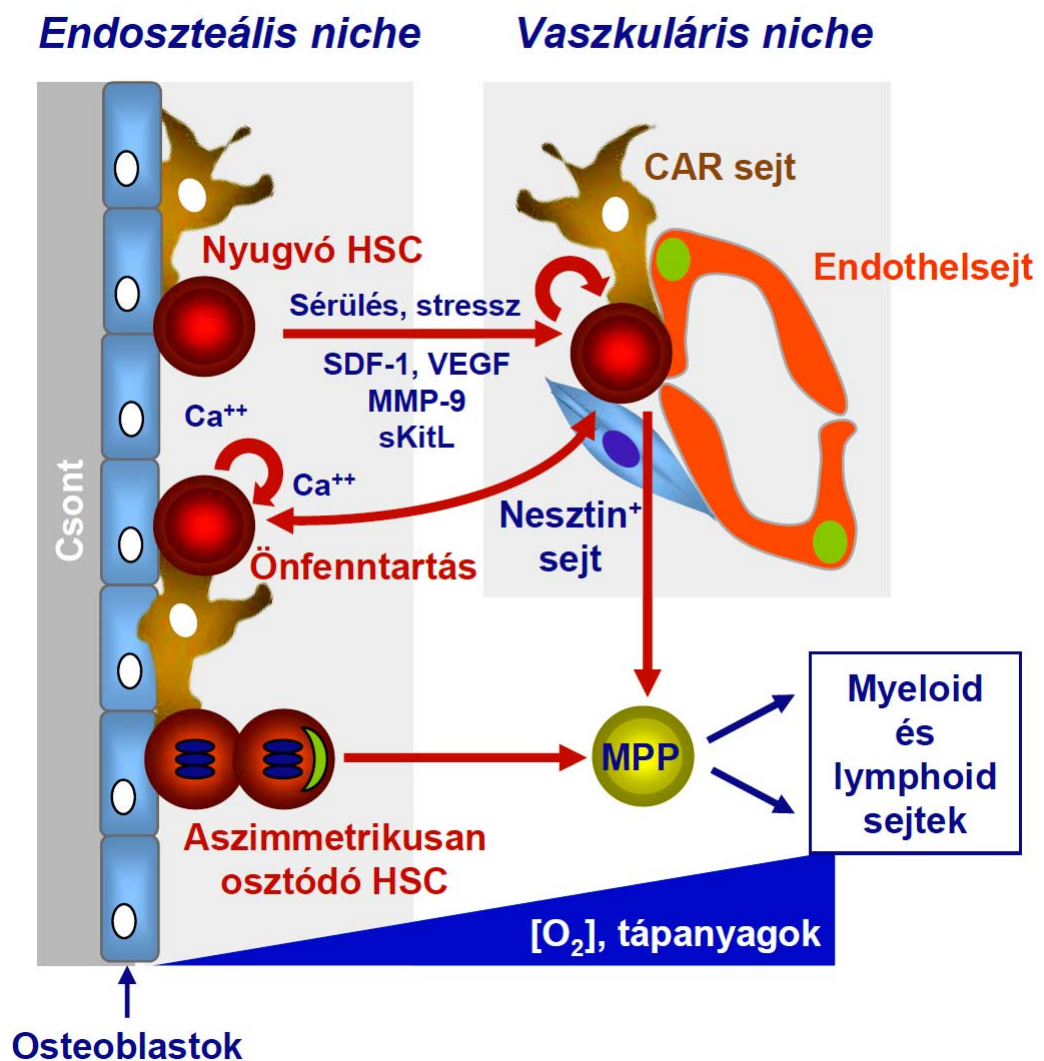
Az utóbbi években azonban kiderült, hogy létezik egy lympho-myeloid (vagy lymphoid irányba eltolódott) multipotens elődsejt (LMPP), aminek nincs erythromyeloid potenciálja, viszont – a lymphoid sejtek mellett - granulocyták és macrophagok is keletkezhetnek belőle (6. ábra) (Adolfsson J et al, 2005; Lai AZ et al, 2005). A hematopoézis „fája” tehát nem olyan szimmetrikus, ahogy ezt korábban gondoltuk. Az erythrocyta-megakaryocyta fejlődési vonal jobban elválik a többi myeloid sejt fejlődésétől, ugyanakkor a lymphoid sejtek és a fagocitasejtek között sokkal közelebbi a rokonság, mint a „klasszikus” hematopoézis modell(ek)ben. Ennél is fontosabb, hogy még az LTRA HSC kompartment sem egységes. Az egér őssejtek egy része – az ún. „aktív” HSC-k - körülbelül 5 hetenként, míg a másik – „nyugvó”, vagy „tartalék” (dormant) – populáció sejtjei csak átlagosan 21 hetenként osztódnak (Wilson A et al, 2008). Ráadásul az egyes HSC-k differenciálódási képessége sem azonos. Vannak myeloid irányba eltolódott (My-bi – myeloid-biased), kiegyensúlyozott (Bala – balanced), és lymphoid irányba eltolódott (Ly-bi) őssejtek, amelyekből elsősorban myeloid, myeloid és lymphoid, illetve inkább lymphoid sejtek keletkezhetnek. Közülük a myeloid irányba eltolódott HSC-k a leghosszabb életűek, idős korban ezek jutnak túlsúlyba a vérképző rendszerben és feltehetően ezért tolódik el a vérkép myeloid irányba az öregedés során (Dykstra B et al 2011; Müller-Sieburg C et al, 2012).



6. ábra. A hematopoézis sematikus ábrázolása a tartós, illetve átmeneti repopulációra képes egér vérképző őssejtek legfontosabb sejtfelszíni markereinek feltüntetésével

E bonyolult rendszer működését a vérképző őssejt „niche” biztosítja, ami két - ún. endoszteális és vaszkuláris - kompartmentből áll (7. ábra) (Yin T and Li L, 2006). Az endoszteális „niche” legjobban karakterizált, kanonikus alkotó elemei a fiatal, orsó alakú osteoblastok. Számuk növekedésével a HSC-k mennyisége is nő a csontvelőben (Calvi LM et al, 2003), ablációjuk viszont a vérképző őssejtek számának csökkenésével jár (Visnjic D et al, 2004). Az osteoblastok egyrészt a HSC-k és a különböző vérsajtfejlődési sorok irányába elkötelezett elődsejtek osztódásához és differenciálódásához nélkülözhetetlen mediátorokat termelnek, úgymint Wnt fehérjét (Fleming H et al, 2008), stroma-eredetű faktor 1-et (SDF-1/CXCL12) (Jung Y et al, 2006), osteopontint (Stier S et al, 2005), angiopoetint, trombopoetint, granulocyta kolónia-stimuláló faktort (G-CSF), granulocyta-macrophag kolónia-stimuláló faktort (GM-CSF), és IL-6-ot (Taichman RS et al, 1996) –. Másrészt számos olyan adhézións molekulát - N-kadherint, vaszkuláris sejt adhézións molekula 1-et (VCAM-1), intracelluláris adhézións molekula 1-et (ICAM-1), melanoma sejt adhézións molekulát (MCAM, CD146), és CD44-et - fejeznek ki a felszínükön, amik elengedhetetlenek a HSC-k megfelelő „kihorgonyzásához” (Haug J et al, 2008; Kiel MJ and Morrison SJ, 2008). Ugyancsak nagy sűrűségben találhatók a felszínükön Notch

ligandumok (részletesen ld: az 1.3.1.-ben) (Bigas A and Espinosa L, 2012). *In vitro* kultúrában az endoszteális sejtekkel együtt tenyésztett HSC-k osztódás után is megőrzik önfenntartó képességüket (Chitteti BR et al, 2010). A közelmúltban az endoszteális sejtek és a HSC-k szoros fizikai kapcsolatát három-dimenziós képalkotásra alkalmas módszerekkel *in vivo* is sikerült megerősíteni (Lo Celso C et al, 2009). Igazolták, hogy a frissen transzplantált LTRT HSC-k igen gyorsan az endoszteumhoz vándorolnak, míg a különböző fejlettségű elődsejtek inkább elszórtan helyezkednek el a csontvelőben (Takaku T et al, 2010).



7. ábra. A vérképző őssejt „niche” sematikus ábrázolása

A vaszkuláris „niche” endothel sejtjei vaszkuláris endothelialis növekedési faktor receptor 2 (VEGFR-2) és CD31 pozitívok, de őssejt-antigén 1-et (Sca-1) nem expresszálnak (Hooper AT et al, 2009). Az osteoblastokhoz hasonlóan számos citokint és kemokint termelnek, úgymint Flk-2/Flt-3 ligandumot (FL), SDF-1/CXCL12-t, G-CSF-et, GM-CSF-et, M-CSF-et, őssejt-faktort (SCF, vagy c-kit ligand), és IL-6-ot (Rafii S et al, 1997). Felszínükön nagy mennyiségű Jagged-1 (egy Notch ligandum) és számos adhéziós molekula - E-szelektin, P-szelektin, VCAM-1, ICAM-1 (Mazo IB et al, 1998; Butler JM et al, 2010) - található. A többi, a vaszkuláris „niche” kialakításában résztvevő sejt már jórészt mesenchymális eredetű. Ezek az SDF-1/CXCL12-ben gazdag retikuláris (CAR) sejtek (Sugiyama T et al, 2006), amelyek az emberi csontvelőben CD146 pozitívok (Sacchetti B et al, 2007), elsősorban SDF-1/CXCL12-t, SCF-et, és angiopoetin 1-et termelnek. Az egér csontvelőben található nesztin pozitív sejtek szintén sok SCF-et és SDF-1/CXCL12-t szekretálnak. A CXCL12 lokuszba beépülő, diftéria toxin receptort és egy GFP fehérjét kódoló transzgénnel létrehozott CXCL12-DTR-GFP egértörzs felnőtt egyedeiben, diftéria toxin adásával, szelektíven elpusztítható a nesztin pozitív stroma sejtek jórésze. Ilyenkor a HSC-k mintegy 50%-a szintén elpusztult (Omatsu Y et al, 2010). Sajnos nem tudjuk biztosan, hogy a CAR sejtek és nesztin pozitív – egyaránt MSC eredetű - sejtek között van-e átfedés, vagy netán azonosak-e. Igaz, CAR sejteket nem csak a perivaszkuláris régióban, hanem az endoszteális felszín közelében is találtak, míg nesztin pozitív MSC-ket csak az erek közelében sikerült kimutatni (Méndez-Ferrer S et al, 2010). Valójában azonban az erek mind a lapockában, mind a csöves csontokban oly közel futnak az endoszteumhoz (Lo Celso C et al, 2009), hogy kérdéses, anatómiailag ténylegesen elkülönül-e egymástól az endoszteális és a vaszkuláris „niche”. Lehetséges, hogy csak funkcionális különbségről van szó, amennyiben az endoszteális „niche” elsősorban a „nyugvó”, vagy „tartalék” HSC-k, a vaszkuláris „niche” pedig az „aktív” vérképző őssejtek otthona (Kiel MJ and Morrison SJ, 2008; Wang et al, 2011).

További, a vérképzés szabályozásában résztvevő sejtek az ugyancsak MSC eredetű adipocyták, amelyek gátolják a HSC-k működését (Naveiras O et al, 2009), valamint a hematopoetikus eredetű macrophagok. A csontvelői macrophagok depléciója általában vérképző ősz- és elődsejt mobilizációt okoz (Chow A et al, 2011). A „niche” működése azonban nem csak az őt alkotó sejtek és az ezek által termelt mediátorok függvénye. A kalcium-ion koncentráció, a csontvelőben uralkodó parciális oxigén-nyomás (hypoxia), az oxidatív gyökök koncentrációja, és különböző mechanikai hatások is befolyásolják a vérképzést (Wang LD and Wagers AJ, 2011). A szimpatikus idegi szabályozást a

csontvelőben található idegvégződések, illetve az MSC-k $\beta 2$ -es és $\beta 3$ -as, valamint az osteoblastok $\beta 3$ -as adrenerg receptorai biztosítják. Stressz hatására csökken az SDF-1/CXCL12 expressziója a stroma sejtekben, ami HSC mobilizációt okoz. A mobilizáció cirkadián ritmusa (egérben reggel, emberben az esti órákban maximális) szintén idegi szabályozás alatt áll (Mendez-Ferrer S et al, 2008).

1.3.1. A Notch-jeltovábbító rendszer szerepe a vérképzés szabályozásában

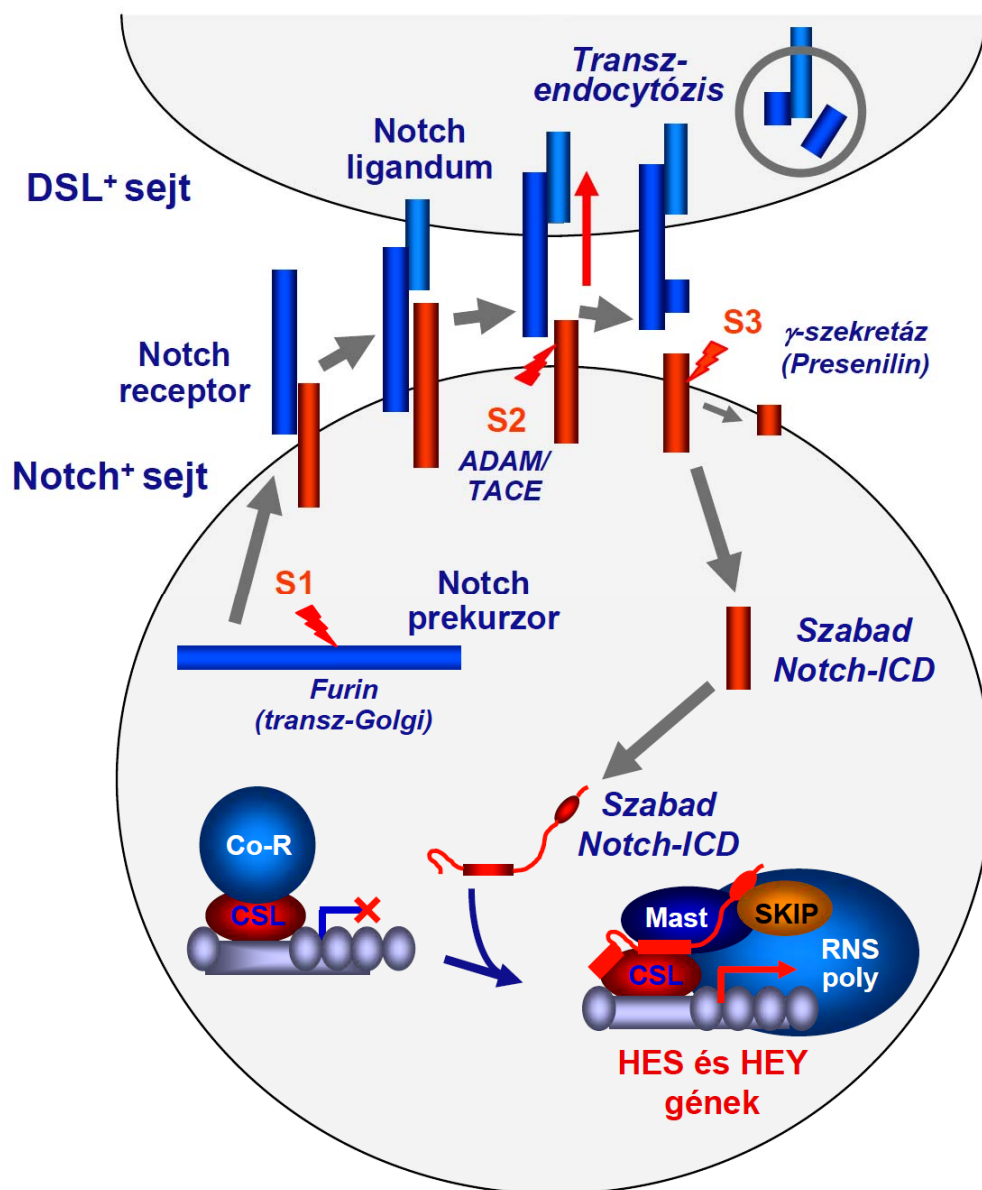
A Notch egy filogenetikailag ősi jeltovábbító út, amelyet először Thomas H. Morgan és mtsai (Morgan TH, 1917) írtak le *Drosophila* mutánsokban. A Notch receptorok és ligandumaik transzmembrán doménnel rendelkező sejtfelszíni glikoproteinek. Emberben és egérben 4 Notch receptor és legalább 5 ligandum létezik: Notch1-4, illetve Jagged-1, -2 és Delta-1, -3, -4 (2. táblázat). A receptor molekulák egy ~300 kD tömegű polipeptidláncként szintetizálódnak, majd a poszt-Golgi kompartmentben a furin nevű proteáz elhasítja (S1) őket (8. ábra). Az így létrejött heterodimer fehérjéket nem-kovalens kötések tartják össze. A sejtfelszínre kikerült receptor molekulák – amennyiben ligandummal találkoznak - tovább hasadnak. Egy membránhoz közeli és egy intramembrán proteolízis (S2 és S3) eredményeként a molekula intracelluláris része leválik, és a sejtmagba jut. A magban ez a polipeptid kapcsolatba lép a CSL transzkripciós faktorrall. (A CSL név a más-más fajokban jellemző, de nagyfokú homológiát mutató, konzervatív CBF1/RBP-J κ (Centromere promoter factor 1/Recombination-signal Binding Protein, emlősök); a Su(H) (Suppressor of Hairless, *Drosophila*); és a LAG-1 (Longevity Assurance Gene 1, *C. elegans*) transzkripciós faktorok nevének kezdőbetűiből tevődik össze). A CSL transzkripciós faktor egy korepresszor komplex részeként gátolja az ugyancsak transzkripciós faktorokat kódoló HES és HEY gének (a *Drosophila* Hairy és Enhancer of Split, En(spl), emlős homológjai) átírását. A sejtmagba bejutó, a CSL-hez kapcsolódó Notch intracelluláris polipeptid a represszor fehérjék helyére lép a komplexben, így az koaktivátor komplexé alakul és megkezdődik a HES és HEY gének átírása mRNS-re, majd fehérjére. E fehérjék számos különböző differenciálódási út – többek között a hematopoézis – során nélkülözhetetlen, sejtfejlődési sor-specifikus gén átírását gátolják. A Notch-jelzés során tehát lényegében a HES és HEY génekről átíródó transzkripciós faktorok fejtik ki hatásukat, gátolva bizonyos differenciációs utakat. Így a Notch-jelet fogó sejt általában tartósan megőrzi differenciációs potenciálját, azaz fiatalságát, sorsa több sejtfejlődési sor irányába is nyitott marad (Artavanis-Tsakonas S et al, 1999; Liu J et al, 2010).

2. táblázat. A Notch jeltovábbító rendszer legfontosabb elemei

	Drosophila	Emlősök
Receptorok:	Notch	Notch1, 2, 3, 4
Ligandumok:	Delta	Delta(-like) 1, 3, 4
	Serrate	Jagged-1, 2
Intracelluláris effektorok:	Su(H)	CSL (CBF1/RBP-Jκ)
Szabályozó fehérjék:	Fringe	Lunatic, Radical és Manic Fringe
	Numb	Numb, Numb-like
	Deltex	Deltex-1, 2, 3
	Mastermind	Mastermind-like-1, 2, 3
Célgének:	Hairy, En(spl)	HES1, 5, Hey1

A Notch rendszer és a hematopoézis kapcsolata a t(7;9) kromszóma transzlokációval járó T-sejtes akut leukaemiák (T-ALL) kapcsán merült fel először. Kiderült, hogy a neoplasztikus sejtekben expresszálandó TAN1 onkogén valójában a Notch1 receptor csonka formáját kódolja, ami lényegében a receptor szabad intracelluláris doménjének felel meg. Így a sejtek Notch rendszere folyamatosan aktivált állapotban van akkor is, ha nem találkoznak Notch ligandummal (Ellisen LW et al, 1991). Amikor egér HSC-ket transzdukáltak hasonló - szolubilis Notch1 intracelluláris domént kódoló – génnel, immortalizált vérképző őssejt vonalakat nyertek (Varnum-Finney B et al, 2000). Stier és mtsai (Stier S et al, 2002) igazolták, hogy a folyamatosan aktív Notch1 mind *in vitro*, mind *in vivo* gátolja a HSC-k differenciálódását. Az egésztest besugárzás után ilyen sejtekkel transzplantált egerek csontvelőjében a vad típusú sejtekkel oltott kontroll állatokéhoz képest nőtt az LTRA HSC-k és csökkent a különböző mértékben elkötelezett elődsejtek aránya. GFP transzgenikus riporter egerek - amelyekben a fluoreszcens fehérje expresszióját a Notch rendszer aktiválódása indítja el - csontvelő graftját vad típusú recipiensekbe ültetve a GFP⁺ HSC-k repopulációs képessége jóval nagyobb volt, mint a GFP⁻ őssejteké (Duncan AWE et al, 2005). Később ugyanez a csoport igazolta, hogy *in vitro* elsősorban a zölden fluoreszkáló HSC-k képesek szimmetrikus (önfenntartó) osztódásra (Wu M et al, 2007). A Notch aktivitás tehát gátolja a vérképző őssejtek differenciálódását, segíti az őssejt kompartment változatlan formában történő fenntartását. Ezzel összhangban a HSC „nich”-t alkotó csontvelői stroma sejtek (Karanau FN et al, 2000), osteoblastok (Weber JM et al, 2006), endothel és CAR sejtek (Sacchetti B et al,

2007) nagy mennyiségű Notch ligandumot, elsősorban Jagged1-et fejeznek ki. Konstitutíven aktív parathyroid hormon (PTH) receptort expresszáló transzgenikus egereket PTH-val oltva, a csontvelőben megnő az osteoblastok száma, és – főként - az egyes osteoblastokon kifejeződő Jagged1 mennyisége. Ezzel párhuzamosan nő az LT-HSC-k mennyisége a hormonkezelt állatokban (Calvi LM et al, 2003). *In vitro* kultúrában a tenyésztőtálca aljához kötött – inszolubilizált – Delta ligandumok mind az egér, mind a humán HSC-k osztódását fokozták (Karanau FN et al, 2001; Varnum-Finney B et al, 2003; Ohishi K et al, 2002).



8. ábra. A Notch jeltovábbító rendszer felépítése és működése

Ugyanakkor, ha Jagged-1 floxed ($Jagged-1^{fl/fl}$) egereket Mx1 Cre állatokkal keresztezték, majd az utódokban interferon adásával aktiválták a rekombinááz enzimet, a Jagged1 kiesése semmiféle zavart nem okozott a vérképző rendszer működésében. Megismételve a kísérleteket $Notch1^{fl/fl}$ és $Jagged-1^{fl/fl} / Notch1^{fl/fl}$ egerekkel, hasonló eredményre jutottak (Mancini SJ et al, 2005). Figyelembe véve azonban a Notch rendszer nagyfokú redundanciáját felmerült, hogy a Notch1 és Jagged1 kiesését más Notch receptorok és ligandumok kompenzálhatták a génkiütött állatokban. Ezért Maillard és mtsai (Maillard I et al, 2008) domináns-negatív Mastermind-like1 (dnMAML) mutáns egereket állítottak elő. (A MAML egy olyan szabályozó fehérje, ami mind a négy Notch receptor intracelluláris doménjéhez kötődik, gátolva a receptorokról történő jelátvitelt). Mivel a mutáns egerek csontvelőjét sikerrel transzplantálták myeloablatált recipiensekbe, arra a következtetésre jutottak, hogy a HSC-k repopulációs képességének fenntartásához nincs szükség Notch szignálra. Egy másik, a Notch ligandumok endocitózisához és a receptorok aktivitásához szükséges szabályozó fehérje, a Midbomb-1 (Mib1) inaktiválása viszont egészen más, meglepő eredményre vezetett. Az állatokban súlyos myeloproliferatív betegség (MPD) alakult ki. Ráadásul, ha vad típusú HSC-ket transzplantáltak Mib1 negatív mikrokörnyezetbe, az egerek akkor is megbetegedtek. Konstitutíven aktív Notch1-et, pontosabban annak intracelluláris doménjét expresszáló HSC-ket oltva a Mib1⁻ recipiensekbe az MPD szintén kialakult, de progressziója sokkal lassabb volt, mint a vad típusú graft beültetése után (Kim YW et al, 2008). A Notch jelátviteli utak gátlása a vérképző őssejt „niche”-ben tehát igenis megzavarhatja a hematopoézist.

A ma általánosan elfogadott hipotézis szerint a Notch jeltovábbító rendszer normális működésének főként a vérképző rendszer kialakulásában és a csontvelő károsodást okozó stresszhelyzetek (besugárzás, mérgezés) elhárításában van meghatározó szerepe. Az egyensúlyi vérképzés során más „niche” komponensek esetleg részben helyettesíthetik a Notch aktivitást (Weber JM and Calvi LM, 2010).

1.3.2. Egy lektin – számos funkció

A galektinek evolúciósan ősi, állati és emberi sejtekben egyaránt előforduló lektinek, amelyek szénhidrátkötő doménjük révén elsősorban sejtfelszíni glikokonjugátumokhoz kötődnek. Eddig tizenöt különböző galektin molekulát azonosítottak, közülük a legkorábban felfedezett és ma is a legjobban ismert a galektin-1 (Gal-1). Ez a 14 kDa molekulatömegű, egy szénhidrátkötő doménnel rendelkező, globuláris fehérje megtalálható az ideg- és izomszövetben, vesében, tüdőben,

méhlepényben, az elsődleges (thymus, csontvelő) és másodlagos nyirokszervekben (lép, nyirokcsomók). Tipikusan a citoszolban helyezkedik el, de – megfelelő szignál szekvencia nélkül, ún. nem klasszikus úton - szekretálódik is. A szekretált Gal-1 molekulák homodiméreket alkotnak és a sejtfelszíni, valamint extracelluláris mátrix fehérjék glikozilált oldalláncaihoz kötődve autokrin és/vagy parakrin módon fejtik ki hatásukat (Barondes SH et al, 1994; Yang RY et al, 2008).

A Gal-1 - az adott feltételektől függően - akár pozitív, akár negatív irányba képes befolyásolni a sejt-sejt, sejt-bazális lamina, és sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatásokat (Hughes RC, 2001). Ezzel függhet össze az izomrostok differenciálódásában (Chan J et al, 2006) és az idegsejtek regenerációjában betöltött szerepe (McGraw J et al, 2004), valamint a különböző sejttypusok *in vitro* kultúrában történő proliferációja során megfigyelt bifázisos hatása is (Adams L, et al, 1996). Legfontosabb ismert funkciója azonban a gyulladásos- és immunfolyamatok gátlása. A Gal-1 apoptózist indukál az aktivált T és B sejtekben (Perillo NL et al, 1995, Fajka-Boja R et al, 2002). A Th1/Th2 sejtek egyensúlyát Th2 irányba tolja el (Rabinovich et al, GA et al, 2004), csökkenti a Th1 eredetű citokinek (TNF- α , IFN- γ , IL-2), ugyanakkor fokozza a Th2-es mediátorok (IL-4, IL-5, IL-10) termelését (Cedeno-Laurent F. et al. 2012). Az immunválasz szabályozásában kulcsfontosságú regulátor T-sejtek (Treg) – legalábbis részben – szintén Gal-1-en keresztül fejtik ki hatásukat (Garin MI et al, 2007). A placentában expresszáldó Gal-1 részt vesz a magzat anyai immunrendszerrel szembeni védelmében. A *Gal-1*^{-/-} nőtény egerek jóval kevesebb életképes utódot tudnak világra hozni, ha az apaállat MHC haplotípusa eltér az anyáétól, mint amikor a két szülő ugyanabból a beltenyésztett törzsből származik (Blois SM et al, 2007). A Gal-1 fehérje gátolja a neutrofil és eozinofil granulocyták transzendotheliális migrációját (La M et al, 2003), valamint a hízósejtek degranulációját (Rabinovich G et al, 2000). Állatkísérletekben rekombináns Gal-1 adásával mérsékelhető a kollagén indukálta arthritis (Rabinovich G et al, 1999), a kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) (Offner H et al, 1990), az 1-es típusú diabetes (Perone MJ et al, 2009), a myasthenia gravis (Levi G et al, 1983), és a *graft versus host* betegség (GVHD) (Baum LG et al, 2003) progressziója. Nagyon keveset tudunk a Gal-1-nek a hematopoézisre gyakorolt esetleges hatásáról, annak ellenére, hogy a csontvelői stroma sejtek – MSC-k, CAR sejtek – valamint a vérképző őssejt „niche” kialakításában ugyancsak érintett endothel sejtek és macrophagok (ld: az 1.3.-ban), kivétel nélkül, nagy mennyiségű Gal-1-et expresszálnak (Rabinovich G and Vidal M, 2011). Ugyanakkor az

MSC-kben kifejeződő Gal-1-nek az őssejtek immunszuppresszív aktivitásában (ld: az 1.5.-ben) betöltött szerepét már leírták (Giesecke F et al, 2010; Lepelletier Y et al, 2010).

1.4. MSC „homing” és szövetregeneráció

Tisztázatlan, hogy az MSC-k normális fiziológiás körülmények között kijuthatnak-e a keringésbe? Néhány szerző talált ugyan minimális mennyiségű MSC-t a vérben, de másoknak ezt nem sikerült megerősíteniük (He Q et al, 2007). Minimális – igaz szignifikáns - MSC mobilizációt indukálható G-CSF kezeléssel (Tondreau T et al, 2005), hypoxiában, vagy szövetsérüléssel (Wang C et al, 2008). Sikeres csontvelő transzplantáció (BMT) után a beteg stroma állománya recipiens eredetű marad, legfeljebb közvetlenül a beavatkozás után, és akkor is csak átmenetileg lehet 1-2% donor eredetű stroma sejtet kimutatni a regenerálódó csontvelőben (Galotto M et al, 1999). Így tulajdonképpen meglepő, hogy állatkísérletekben nagyon sokféle sejt, illetve szövetpusztulással járó betegséget sikerült gyógyítani- vagy legalábbis a betegség progresszióját lassítani- szisztémás MSC kezeléssel. Közéjük tartozik a szívinfarktus, a vese- és tüdőkárosodás, valamint különböző traumás agy- és gerincsérülések (Hong HS et al, 2012). A terápiás hatás annak ellenére megfigyelhető, hogy a beadott MSC-knek általában csak egy töredéke jut el a sérülés helyére. Infarktuson átesett patkányok szívének bal kamrájába juttatott MSC-k megoszlását vizsgálva például kiderült, hogy a károsodást követő 2. napon adott MSC-k alig 1%-a található a szívben 4 órával az infúzió után. Még rosszabb eredményt kaptak, ha az őssejteket csak az infarktus utáni 10., vagy 14. napon, illetve intravénásan adták az állatoknak. Utóbbi esetben a bevitt sejtek zöme a tüdőben, a májban, és a lépben koncentrált (Barbash IM et al, 2003). Ischaemiás, illetve traumás agysérülés után intravénásan adott allogén, vagy emberi (xenogén) MSC-kkel kezelt patkányokban – a neurológiai funkciók javulása ellenére – igen kevés donor eredetű, ill. emberi sejtet találtak az állatok agyában (Chen J et al, 2001; Mahmood A et al, 2003). Bleomycinnel kezelt egerek tüdejében allogén MSC-k intravénás adásával sikerült mérsékelni a gyulladást és csökkenteni a kollagén lerakódást (Ortiz LA et al, 2003). Kísérletes autoimmun encephalomyelitis (EAE) egerekben az intravénásan adott EGFP pozitív MSC-k szintén gyulladásgátló hatásúak voltak és a remyelinizációt is segítették, annak ellenére, hogy a központi idegrendszerben nem találtak számottevő mennyiségű EGFP⁺ sejtet (Zappia E et al, 2005). Wu és mtsai (Wu J et al, 2008) azt is igazolták, hogy egy határon túl a sejtszám emelésével sem növelhető a sérült szövetekbe bevándorló MSC-k mennyisége.

Az ischaemiás vagy sérült szövetek tehát bizonyos mértékig „vonzák” az MSC-ket, *in vivo* azonban a szisztémásan bevitt sejtek jó része elakad a sok kapillárisal rendelkező szervekben, elsősorban a tüdőben. Ennek vélhetően elsősorban fizikai okai vannak: a sejttenyészetben növekedett MSC-k nagyméretűek és könnyen aggregálódnak, így nehezen jutnak át a kapillárisokon és – általában a posztkapilláris venulákban – elakadnak (Sackstein R et al, 2008; Walczak P et al, 2008). Fischer és mtsai szerint (Fischer UM et al, 2009) például 38 órával az infúzió után a beadott allogén MSC-k több mint 90%-a a „tüdő csapdában” található, de kimutatható mennyiségű összejt kerül a májba, a lépbe és a vesékbe is. A szívinfarktuson átesett egerekbe oltott humán MSC-k sorsát az emberi Alu-szekvenciákra specifikus real-time PCR segítségével tudták követni a kezelt állatokban. A sejtek 99%-a 5 perccel a beadás után eltűnt a keringésből. További 20-30 perc elteltével 2-3%-uk ismét megjelent a vérben, az emberi DNS 83%-a azonban az egerek tüdejében koncentrált (Lee RH et al, 2009). Más szervekben gyakorlatilag nem találtak emberi DNS-t. Megjegyzendő azonban, hogy ez a PCR alapú módszer egy nagyságrenddel kevésbé érzékeny, mint a korábban alkalmazott radiokatív jelölés(ek). Az élő állatba szisztémásan bevitt, luciferáz enzimmel jelölt (biolumineszcens) MSC-k vizsgálatokor kiderült, hogy egészséges állatokban az MSC-k átmenetileg megjelennek ugyan a tüdőben, de egy nap múlva onnét is eltűnnek (Wang H et al, 2009). Ugyanakkor beteg állatokban a tüdőn kívül a gyulladásos vagy daganatos terület(ek)en is jól láthatók a jelölt MSC-k (Spaeth E et al, 2008).

Bár a „tüdő” vagy „kapilláris csapda” a szisztémásan szervezetbe juttatott MSC-k jórészt valóban kiszűri, az összejtek „homing”-ja – legalábbis sérült vagy beteg állatokban – részben specifikus, aktív folyamat. Amikor szubletálisan besugárzott, illetve kezeletlen kontroll NOD/SCID egerekbe humán MSC-ket oltottak intravénásan, majd 15 nap múlva megvizsgálták az MSC-k előfordulását a különböző szervekben, kiderült, hogy a sugársérülésnek kitett állatok agyában 2,8-szer, szívében 3-szor, májában 2,5-szer, csontvelőjében 2,6-szer annyi emberi sejtet találtak, mint a kontroll egerek azonos szerveiben. Egyedül a tüdőbe került MSC-k mennyiségében nem volt szignifikáns különbség a két kísérleti csoport között, ami arra utal, hogy a tüdő valóban csak passzív sejtcsapdaként működik az MSC kezelése során (Francois S et al, 2006). Ha olyan MSC-ket adtak infarktuson átesett egereknek, amelyeknek $\beta 1$ integrinjét specifikus ellenanyaggal blokkolták, jelentősen romlott a sejtek terápiás hatása és kevesebb MSC-t lehetett kimutatni az állatok szívében (Ip JE et al, 2007). Sackstein és mtsai (Sackstein R et al, 2008) az MSC-k sejtfelszíni CD44 molekuláit kémiai E-szelektin kötővé alakították,

amivel jelentősen fokozni tudták az intravénásan adott sejtek csontvelőbe vándorlását. Intravitális mikroszkóppal végzett vizsgálatok pedig azt igazolták, hogy P-szelektin génkiütött egerekben kevesebb intravénásan adott MSC akad el a posztkapilláris venulákban, mint a vad típusú állatokban (Ruster B et al, 2006). A különböző sejtadhéziós molekuláknak tehát fontos szerepük van az MSC-k homingjában.

A következő kérdés természetesen az, mi vonzza az ischaemiás vagy sérült területek felé az MSC-eket? Mivel a különböző sejtek – leukocyták, hematopoetikus őse- és elődsejtek – mozgását általában kemokin gradiensek irányítják, nem meglepő, hogy az MSC-k migrációjában is ezek a mediátorok játsszák a főszerepet. Így például már a hematopoézis során megismert CXCR4 – SDF-1(CXCL12) „tengely” képes arra is, hogy segítse az MSC-k migrációját az infarktuson átesett egerek szíve (Kawada H et al, 2004), vagy a cukorbeteg állatok pancreasa felé (Sordi V et al, 2005). A kemotaxis elindítója, hogy a károsodott szövetekből nagy mennyiségű CXCL12 szabadul fel, az MSC-k – vagy legalábbis egy részük – pedig CXCR4 receptorokat expresszál a felszínén. A daganatok közül a gliomák szintén szekretálnak SDF-1-et, valamint monocyta kemotaktikus fehérje 1-et (MCP-1), mely kemokinekkel hatékonyan csalogatják a daganat területére az őssejteket (Xu F et al, 2010). Tekintettel arra, hogy az ismert kemokin receptorok jó része megtalálható az MSC-k felszínén, ráadásul maguk az őssejtek is sokféle kemokint termelnek (3. táblázat), a CXCR4 – SDF-1(CXCL12) tengelyhez hasonló lehetséges parakrin - vagy sokszor akár autokrin - kölcsönhatások száma szinte végtelen (Honczarenko M et al, 2006; Ringe J et al, 2007; Chamberlain G et al, 2007).

Terápiás szempontból az sem lényegtelen, hogy mennyi ideig élnek egyáltalán az *in vitro* kultúrában nevelt, majd a szervezetbe visszajuttatott MSC-k. Az eddig idézett munkák jórésztében csak néhány napig, legfeljebb pár hétig tudták kimutatni a beadott őssejtek nyomát a kezelt állatokban. Hasonló a helyzet a BMT-t követő, szteroid rezisztens, akut GVHD miatt MSC-vel kezelt betegekben is. Bahr és mtsai (Bahr L et al, 2012) 15 ilyen betegből származó, összesen 108 szövetmintában vizsgálták a donor sejtek előfordulását a tüdőben, a nyirokcsomókban, és a vékonybélben. Megállapították, hogy MSC eredetű DNS maximum 1/100 és 1/1000 közti arányban fordul elő a betegek egy, vagy gyakran több szövetmintájában, és mennyisége az idővel gyorsan csökken. Azok között, akik 50 napnál rövidebb ideje kapták az MSC infúziót, 13 betegből 9-ben találtak pozitív mintát, vagy mintákat. Azoknál viszont, akik ennél régebben részesültek a kezelésben, ez az arány már csak 8/2 volt. Az is igaz viszont, hogy nem találtak

összefüggést a betegekben kimutatható donor eredetű DNS mennyisége és a terápia hatékonysága között.

3. táblázat. A mesenchymalis őssejtek felszínén kifejeződő kemokin receptorok és ligandumaik

Receptorok	Ligandumok	
	<i>MSC-k által is szekretált (potenciálisan autokrin/parakrin) kemokinek</i>	<i>Egyéb, MSC-k által nem termelt kemokinek</i>
CCR1	CCL3 (MIP-1 α), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3)	CCL9/10, 14, 15, 16, 23
CCR2	CCL2 (MCP-1), CCL7	CCL13, 16
CCR3	CCL5, CCL7, CCL26 (eotaxin-3)	CCL8, 11, 13, 15, 24, 28
CCR4		CCL17, 22
CCR5	CCL3, CCL4 (MIP-1 β), CCL5	CCL8, 14, 15
CCR7		CCL19, 21
CCR9		CCL25
CX₃CR1	CX ₃ CL1 (fraktalkin)	
CXCR3	CXCL10 (IP-10), CXCL11 (i-TAC)	CXCL9
CXCR4	CXCL12 (SDF-1)	
CXCR5		CXCL13
CXCR6		CXCL16

IP-10, interferon-indukált fehérje 10; i-TAC, interferon-indukált T-sejt kemoattraktáns- α ; MCP-1, macrophag kemoattraktáns fehérje 1; MIP, macrophag gyulladásos fehérje; és SDF-1, stroma-eredetű faktor 1.

A szisztémásan a szervezetbe juttatott MSC-knek tehát csak viszonylag kis része éri el a megcélzott szervet, beépülésük a károsodott szövetekbe általában minimális, ráadásul rövid időn belül el is pusztulnak *in vivo* (Karp JM and Teo GS, 2009). Így nem valószínű, hogy helytállóak azok a korai elképzelések, miszerint az MSC-k a sérült, illetve elpusztult sejtek helyére beépülve, transzdifferentiálódás útján fejtik ki a hatásukat, ahogy ezt többek között a szív (Toma C et al, 2002) és a pancreas (Ianus A et al, 2003) regenerációja

kapcsán is leírták. Bár a transzdifferentiáció kétségtelenül létező jelenség, *in vivo* egyértelműen igen ritka, azaz olyan kevés MSC-t érinthet, aminek nem lehet terápiás hatása (Graf T, 2011). Az a lehetőség is felvetődött, hogy az őssejtek képesek fuzionálni testi sejtekkel, különösen olyanokkal (Purkinje-sejtek, hepatocyták, szívizom rostok), amelyek amúgy is hajlamosak többmagvú képletekbe rendeződni, és így regenerálják a károsodott idegsejteket, májat, vagy szívet (Alvarez-Dolado M et al, 2003). A spontán sejtfúzió azonban legalább olyan ritka esemény *in vivo*, mint a transzdifferentiálódás, és szerepe a regenerációs folyamatokban nem igazolható (Noiseux N et al, 2006). Ugyanakkor jól tudjuk, hogy az MSC-k számtalan olyan, biológiailag aktív mediátort termelnek, amelyek direkt vagy indirekt úton segíthetik a regenerációs folyamatokat. A legfontosabb ilyen, Caplan és Dennis (Caplan AI and Dennis JE, 2006) által összefoglalóan „trofikus faktoroknak” nevezett anyagokat a 4. táblázatban (Gnecchi M et al, 2008 és Williams AR and Hare JM, 2011 nyomán) soroltuk fel. Ezek között vannak angiogenezist és az extracelluláris mátrix átrendeződését indukáló, apoptózist és/vagy fibrosist gátló, valamint az endogén szöveti őssejtek osztódását és differentiálódását segítő faktorok. A szisztémásan adott MSC-k endogén regenerációt indukáló hatását a szív (Hatzistergos KE et al, 2010), a máj (Parekkadan B et al, 2007; van Poll D et al, 2008) a pancreas (Bell GI et al, 2012) és a vese (Morigi M et al, 2010) esetében egyaránt igazolták. Az őssejt kezelést követően kialakuló új kapillárisokat például a szív koszorúér rendszerében (Li H et al, 2010) és a hasnyálmirigy szigetekben (Hess D et al, 2003; Bell GI et al, 2012a) mutattak ki. A cukorbetegség következtében károsodott pancreas MSC-indukált regenerációjának mechanizmusát vizsgálva, a hepatocyta növekedési faktor (HGF) (Izumida Y et al, 2005; Mellado-Gil J et al, 2011; Flaquer M et al, 2012), az inzulin-szerű növekedési faktor 1 (IGF-1) (Agudo J et al, 2008), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) (Chen H et al, 2011), és a prosztaglandin E2 (PGE2) (Vennemann A et al, 2012) szerepét igazolták. A fenti – parakrin és trofikus - hatásmechanizmus egyértelmű magyarázatot ad arra, hogy a keringésbe juttatott, jórészt a tüdőben felhalmozódó, valószínűleg néhány napon belül elpusztuló MSC-k hogyan képesek mégis kifejteni terápiás hatásukat a legkülönbözőbb okokra visszavezethető sejt, illetve szövetpusztulással járó betegségekben. Az MSC-k közvetett hatására utal az is, hogy a közelmúltban leírták, az MSC-k embolizációja a tüdőben kifejezetten fokozza az sejtek mediátor termelését (Bartosh TJ et al, 2010).

4. táblázat. A mesenchymalis őssejtek által termelt legfontosabb autokrin/parakrin faktorkok

Faktor	Funkció
Angiogén faktorkok:	
Fibroblast növekedési faktor-2 (FGF-2)	Endothel és simaizom sejtek proliferációja↑
Fibroblast növekedési faktor-7 (FGF-7)	Endothel sejtek proliferációja↑
Monocyta kemotaktikus fehérje 1 (MCP-1)	Angiogenesis↑, monocyták migrációja
Vérlemezkre eredetű növekedési faktor (PDGF)	Simaizom sejtek proliferációja↑
Placenta-eredetű növekedési faktor (PIGF)	Angiogenesis↑
Transzformáló növekedési faktor β (TGFβ)	Erek érése↑
Vaszkuláris endothelialis növekedési faktor (VEGF)	Endothel sejtek osztódása, migrációja, és érése↑
Extracelluláris mátrix átrendeződést indukáló faktorkok:	
Metalloproteináz-1 (MMP1)	Mátrix fellazulása, tubulus képződés
Metalloproteináz-2 (MMP2)	Mátrix fellazulása, tubulus képződés
Metalloproteináz-9 (MMP9)	Mátrix fellazulása
Plazminogén aktivátor (PA)	Mátrix degradációja
Tumor-nekrózis faktor alfa (TNF-α)	Mátrix degradációja, sejtosztódás↑
Őssejtek túlélését, osztódását és migrációját segítő faktorkok:	
Fibroblast növekedési faktor 2 (FGF-2)	Endothel és simaizom sejtek proliferációja↑
Granulocyta kolónia-stimuláló faktor (G-CSF)	Granulocyták osztódása és érése↑
Hepatocyta növekedési faktor (HGF)	Sejtosztódás↑, regeneráció↑, apoptózis↓
Inzulin-szerű növekedési faktor 1 (IGF-1)	Sejtosztódás↑, apoptózis↓
Macrophag kolónia-stimuláló faktor (M-CSF)	Monocyták/macrophagok osztódása és differenciálódása↑
Thymozin-β4 (Tβ4)	Sejtmigráció↑
Stroma-eredetű faktor 1 (SDF-1)	Ős- és elődsejtek homingja↑

1.5. Immunszuppresszió és gyulladásgátlás

Nincs olyan, a természetes és/vagy az adaptív immunválaszban résztvevő sejt, aminek működését az MSC-k ne befolyásolnák (Shi Y et al, 2010). Terápiás hatékonyságuk szempontjából ez meghatározó lehet, hiszen minden sejtpusztulással járó folyamat – legyen az mechanikai sérülés, fertőzés, vagy éppen autoimmun folyamat következménye – védekező reakciót indít el a szervezetben (Medzhitov R, 2008).

1.5.1. Immunszuppresszió *in vitro*

Az MSC-k *in vitro* kultúrában gátolják a monocyták és a hematopoetikus ős-, illetve elődsejtek dendritikus sejt (DC) irányú differenciálódását és érését. Csökkentik a DC-k felületén expresszálandó MHC-II-es antigének és kostimulátor molekulák (CD40, CD80 és CD86) expresszióját. Gátolják a gyulladásos citokinek (IL-12 és TNF- α) termelését, ugyanakkor a gyulladásgátló mediátorok (IL-10, TGF- β) termelését fokozzák. MSC-k jelenlétében tehát a DC-k antigén-bemutató és gyulladásokeltő képessége erőteljesen csökken, illetve az immunválaszt gátló, ún. „tolerogén” DC-k száma megnő (Jiang X et al, 2005; Ramasamy R et al, 2007). Ugyancsak gátolják a mitogénnel (ConA, PHA), anti-CD3- és anti-CD28-ellenanyaggal, vagy alloantigénnel aktivált T-sejtek proliferációját (Di Nicola M et al, 2002). A hatás MHC-független, autológ és allogén MSC-k gyakorlatilag azonos mértékben gátolják az aktivált T lymphocyták osztódását (Le Blanc K et al, 2003). Az érintett T-sejtek általában nem pusztulnak el, csak anergiássá válnak. Citokin termelésük megváltozik, az IFN- γ , TNF- α , IL-6 és az IL-17 mennyisége jelenősen csökken a sejtek felülszójában, míg az IL-4 és az IL-10 koncentrációja nő. Az MSC-k tehát a sejtosztódás gátlása mellett valószínűleg megváltoztatják a Th1/Th2 sejtek arányát is a kultúrákban (Glennie S et al, 2005). Ugyanakkor – más szerzők szerint - az MSC-k az aktivált T lymphocyták pusztulását (apoptózist) is okozhatják (Akiyama K et al, 2012). Az immunválaszt segítő (helper) és citotoxikus T-sejtektől eltérően a Treg sejtek proliferációja és citokin termelése (TGF- β , IL-10, IL-35) viszont fokozódik MSC-k jelenlétében (Di Ianni M et al, 2008). A frissen szeparált természetes ölösejtek (NK-sejtek) IL-2- és IL-15-indukált proliferációját szintén gátolják az MSC-k, de a preaktivált NK-sejtek osztódását már alig lassítják. Magát a citotoxikus reakciót – ha például allogén célsejteket akarunk elpusztítani frissen szeparált NK-sejtek segítségével – az őssejtek nem befolyásolják. Ha viszont MSC-k jelenlétében IL-2-vel 4-5 napig előaktiváljuk az NK-

sejteket, akkor a célsejtek hozzáadása után már csökkent citotoxikus aktivitást tapasztalunk és – egyidejűleg – kevesebb gyulladásos citokint (IFN- γ és TNF- α) termelnek a természetes ölősejtek (Spaggiari GM et al, 2006). Jóval kevesebbet tudunk az MSC-k és B-lymphocyták közti kölcsönhatás funkcionális következményeiről. Egyes munkacsoportok szerint az MSC-k gátolják az emberi B-sejtek osztódását és ellenanyag-termelő plazmasejteké történő differenciálódását (Corcione A et al, 2006). Mások szerint viszont a B-sejt-aktiváció erősségétől függ, hogy az MSC-k gátolják, vagy éppen fokozzák az ellenanyag-termelést *in vitro* kultúrában (Traggiai E et al, 2008).

Az MSC-k macrophagokra (M Φ) gyakorolt hatását csak a közelmúltban kezdték vizsgálni. Az eddigi – mindössze néhány közleményen alapuló - eredmények szerint ezek a rendkívül plasztikus sejtek MSC-k jelenlétében inkább M2-es (alternatív úton aktivált) fenotípust mutatnak, azaz elsősorban gyulladásgátló citokineket (IL-10, IL-4, IL-13, TGF- β), és a szövetregeneráció során nélkülözhetetlen VEGF-et, valamint epidermalis növekedési faktort (EGF) termelnek. Fagocitáló képességük is nagyobb, mint a „gyulladásos” (M1-es) macrophagoké. Az MSC- M Φ kölcsönhatás során tehát főként gyulladásgátló, a pusztuló (apoptotikus) sejteket – például neutrofil granulocytákat - hatékonyan fagocitáló és a sebgyógyulást elősegítő sejtek alakulnak ki (Maggini J et al, 2010; Cutler AJ et al, 2010).

1.5.2. Immunszuppresszió in vivo

Elsőként páviánokon figyelték meg, hogy MSC-k szisztémás adásával megnövelhető az átültetett allogén bőrgraftok túlélése (Bartholomew A et al, 2002). BMT során az MSC-k képesek elősegíteni a szemiallogén és allogén graftok megtapadását, gátolják az akut GVHD kialakulását, illetve mérséklék a betegség súlyosságát (Le Blanc K et al, 2004; Le Blanc K and Mougiakakos D, 2012). EAE-ben, az emberi sclerosis multiplex egy egérmodelljében, az intravénásan, vagy intraperitoneálisan beadott MSC-k elsősorban a szekunder nyirokszervekben telepednek meg, és – ha a betegség kezdeti stádiumában adják őket – hatékonyan gátolják az autoreaktív T- és B-sejtek működését. Az állatok keringésében csökken a gyulladásos citokinek mennyisége, a központi idegrendszerben kevésbé kifejezett a leukocyta beszűrődés és a demyelinisatio (Zappia E et al, 2005; Gerdoni E et al, 2007; Oh DY et al, 2012). MSC-vel kezelt NOD, BXSB és MRL/lpr egerekben nem, vagy csak a vártnál jóval később alakul ki az 1-es típusú diabetes, illetve az emberi SLE-re emlékeztető autoimmun betegség (Madec AM et al, 2009). Kollagén-idukált arthritises állatokban az MSC kezelés csökkenti a gyulladásos

citokinek termelését és megelőzi a csont- és porckárosodást (Augello A et al, 2007). Ugyancsak gátolják az endotoxinnal (LPS) kiváltott lokális és szisztémás gyulladást, sőt részben a sepsist is (Németh K et al, 2009; Gonzalez-Rey E et al, 2009). A bleomycinnel indukált tüdőkárosodás szintén megelőzhető MSC-k adásával. Az őssejtek megakadályozzák a gyulladás és a fibrosis kialakulását a bleomycinnel kezelt egerek tüdejében és csökkentik szérumban TNF- α és IL-1 α szintjét (Rojas M et al, 2005).

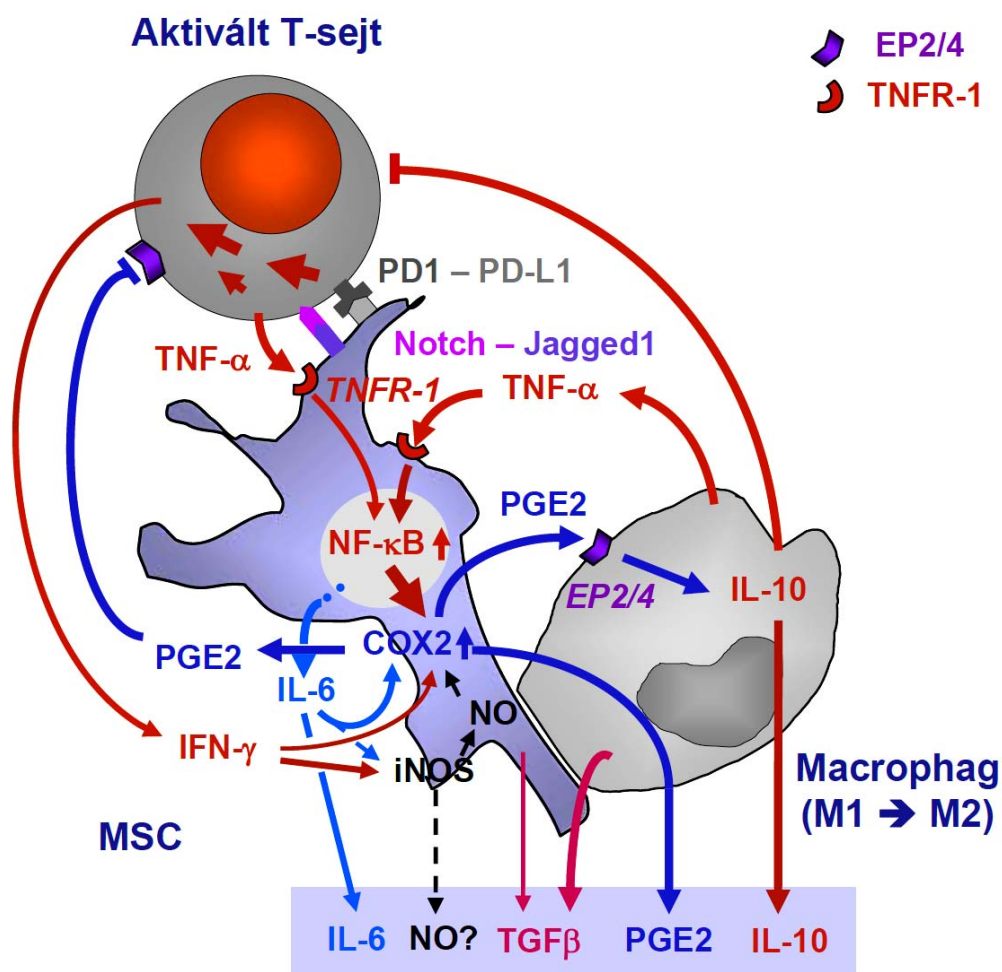
Az MSC-k tehát számos, esetenként nagyon különböző *in vitro* és *in vivo* kísérleti rendszerben képesek kifejtetni gyulladásgátló és/vagy immunszuppresszív hatásukat. Így nem meglepő, hogy a jelenség mechanizmusát máig sem sikerült egyértelműen tisztázni. A különböző munkacsoportok más-más, részben az őssejtek felszínén expresszálandó, részben az általuk szekretált molekula szerepét hangsúlyozzák (5. táblázat, Gebler A et al, 2012; Shi Y et al, 2012 nyomán). A kevés dolog egyike, amiben teljes az egyetértés, hogy az MSC-k csak IFN- γ , illetve IFN- γ és valamilyen gyulladáscitokin (TNF- α vagy IL-1) egyidejű jelenlétében válnak immunszuppresszívvé. Ennek következtében viszont gátolják az aktivált T-sejtek IFN- γ termelését, vagyis negatív visszacsatolás jön létre az MSC-k és a T lymphocyták között (Krampera M et al, 2006; Ryan JM et al, 2007).

5. táblázat. A mesenchymalis őssejtek gyulladásgátló és immunszuppresszív aktivitásáért felelős fontosabb molekulák

Sejt-sejt kölcsönhatásokat közvetítő molekulák:	Szolubilis faktorok:
B7-H1 (PDL1)	Prostaglandin E2 (PGE2)
B7-H4	Indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO)
Jagged1	Nitrogén-monoxid (NO)
Notch receptor(ok)?	TNF- α -indukált gén 6 által kódolt fehérje (TSG-6)
Galektin-1	TGF- β , HGF, IL-10
	Hem-oxigenáz-1 enzim (HO-1)
	IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra)
Egyéb sejtfelszíni molekulák:	Szerin-proteáz inhibitor-6 fehérje (SPI6)
HLA-G	Adenozin
H-faktor	HLA-G

A gyulladásos környezetben „aktivált” (licensed) MSC-k immunszuppresszív hatása aztán részben sejt-sejt kölcsönhatás(ok), részben szolubilis mediátorok révén valósul meg. Ezek – az adott kísérleti rendszertől függően – különbözőek lehetnek, vagyis több párhuzamos, részben redundáns molekuláris mechanizmus felelős a gátlás(ok) kialakulásáért. A folyamat legfontosabb lépéseit – egy „minimális modell” formájában – a 9. ábrán foglaltuk össze. Eszerint a T-sejtek és MSC-k között, az előbbiek PD1 (Programmed cell death 1, CD279) és Notch receptor, illetve az utóbbiak PD-L1 (Programmed cell death 1 ligand 1, CD274) és Jagged-1 molekuláinak közvetítésével jöhet létre közvetlen sejt-sejt kapcsolat. (Augello A et al, 2005; Liotta F et al, 2008; Shi D et al, 2011). Az érintett T-sejtek által termelt IFN- γ , valamint a részben T lymphocytá, részben M Φ eredetű TNF- α együttesen indukálják a ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim expresszióját az MSC-kben. A keletkező PGE2 közvetlenül is képes gátolni az aktivált T-sejtek osztódását, de – ami ennél valószínűleg jóval fontosabb – a M Φ -ok EP2-es és 4-es receptoraihoz kötődve nagy mennyiségű gyulladásgátló citokin, IL-10 (és talán TGF- β) termelését indukálja (Németh K et al, 2009), tehát az M2 fenotípus irányába tolja el a sejteket (Maggini J et al, 2010). Az MSC-k PGE2 szintézisét az IFN- γ azzal is fokozza, hogy az iNOS (indukált nitrogén-oxid szintáz) enzim expresszióját is elindítja az őssejtekben, a termelődő NO pedig ugyancsak növeli a COX2 aktivitást. (Emellett az NO-nak – ha nagy mennyiségben kerül a környezetbe – szintén van közvetlen T-sejt gátló hatása (Ren G et al, 2008). Ráadásul az MSC-k folyamatosan termelnek IL-6-ot, felszínükön pedig IL-6 receptorokat expresszálnak. Ez egy újabb pozitív, autokrin/parakrin visszacsatolási lehetőség, mivel az IL-6 is képes fokozni a *Cox2* gén expresszióját (Bouffi C et al, 2010). (A dendritikus sejtek valószínűleg a M Φ -okhoz hasonlóan viselkednek ebben a rendszerben). A T lymphocyták, MSC-k és M Φ -ok (vagy DC-k) együttműködése során alakulhat ki olyan mikrokörnyezet, ami elősegíti a Treg sejtek aktiválódását és osztódását (Shi Y et al, 2012). Modellünkben természetesen nem minden, az 5. táblázatban felsorolt, MSC-k által termelt immunszuppresszív hatású anyag szerepel. Közéjük tartozik az indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO) enzim, aminek expresszióját szintén az IFN- γ indukálja. Ez az enzim a triptofánt, a sejtek környezetében legkisebb mennyiségben előforduló esszenciális aminosavat kynureninen keresztül pikolén- és kinolénsavra bontja le. Így az IDO-t expresszáló sejt környezetében csökken az aminosav kiindulási koncentrációja, lokálisan ún. „triptofán sivatag” alakul ki. A triptofán hiány és a bomlástermékek valószínűleg együttesen gátolják a lymphocyták (elsősorban a Th1-es és

az NK-sejtek) proliferációját. Az IDO enzim működése tehát könnyen beilleszthető modellünkbe (Meisel R et al, 2004; Jones BJ et al, 2007). Hasonló a helyzet a TSG-6 (TNF- α -indukált gén 6 által kódolt) fehérje esetén, aminek expresszióját ugyancsak gyulladásos citokinek indukálják, és a 35 kD tömegű molekula gyulladásgátló hatása – legalábbis részben – a COX-2 aktivációján alapul (Lee RH et al, 2009; Oh JY et al, 2010). A többi – az 5. táblázatban szereplő - gátló faktor hatásmechanismusáról viszont túl keveset tudunk ahhoz, hogy modellünkben elhelyezhessük őket, pedig feltehetően ezek biztosítják az MSC-közvetített immunszuppresszió kétségtelenül létező alternatív útjait, azaz a rendszer redundanciáját (Prockop DJ and Oh JY, 2012; Gebler A et al, 2012; Shi Y et al, 2012).



9. ábra. **Mesenchymalis őssejtek, T-lymphocyták és macrophagok kölcsönhatása.** A részletes magyarázatot lásd a szövegben.

Azt sem zárhatjuk ki, hogy bizonyos körülmények között az MSC-k működése megváltozhat és a gyulladásos folyamatokat, valamint az immunválaszt – nem antigén-specifikus úton – segítő sejtekké alakulhatnak (Waterman RS et al, 2010). Waterman és mtsai feltételezik, hogy az M1-es és M2-es MΦ-okhoz hasonlóan az MSC-knek is kétféle, eltérő citokin/kemokin profillal jellemezhető aktivációs állapota létezik. Az „M1-es” sejtek elsősorban IL-6-ot és IL-8-at szekretálnak, felszínükön sok Jagged1-t (Notch ligandumot) expresszálnak, tehát gyulladáskeltő és Th1-sejt aktiváló hatásuk van. Az „M2-es” jellegű MSC-k viszont inkább IL-4-et, IL-10-et, és CCL5-öt (RANTES) termelnek, felszínükön pedig csökken a Jagged1 molekulák mennyisége, így gátolják a gyulladásos- és immunfolyamatokat. A feltételezett „polarizáció” kialakulását azzal magyarázzák, hogy az MSC-k aktivációs állapotának jellegét a T-sejtekkel (illetve gyulladásos citokinekkal) való találkozás során az határozza meg, hogy egyidejűleg milyen Toll-ligandum(ok) fordulnak elő az őssejt közvetlen környezetében. (Az MSC-ken gyakorlatilag az összes ismert Toll-receptor (TLR) megtalálható). Eszerint a TLR4-es receptorok ligandumai (BCG, LPS, HSP-k, HMGB1) az M1-es, a TLR3-as receptoroké (ssRNS, dsRNS) viszont inkább az M2-es irányba viszik a sejteket (DelaRosa O and Lombardo E, 2010). E szellemes elképzelés legfőbb gyengéje az, hogy (i) a különböző Toll-ligandumokkal stimulált MSC-k működésének *in vitro* vizsgálata során kapott eredmények rendkívül ellentmondásosak (Liotta F et al, 2008; Lombardo E et al, 2009; Opitz CA et al, 2009); (ii) *in vivo* pedig – mint ezt már láttuk – az őssejtek gátolják az LPS-el kiváltott lokális és szisztémás gyulladást, sőt részben a sepsist is (Németh K et al, 2009; Gonzalez-Rey E et al, 2009). Az MSC-k és az immunrendszer viszonya tehát még korántsem tekinthető végérvényesen tisztázottnak.

1.6. A diabetes mellitus őssejtterápiája – a pancreas regenerációja

A diabetes mellitus a világ népességét sújtó vezető kórok és halálokok egyike. Míg az 1-es típusú cukorbetegség az inzulin-termelő β -sejtek teljes, autoimmun eredetű pusztulásának a következménye, addig a 2-es típusú diabetes hátterében a csökkent inzulinérzékenységre visszavezethető relatív inzulinhiány áll. Mindkét esetben a működőképes β -sejtek számának csökkenése a fellépő hyperglycaemia fő oka. Az őssejtterápia által kínált egyik lehetőség, hogy embrionális, vagy szöveti őssejtekből előállított inzulin termelő sejtek beültetésével pótoljuk az elpusztult β -sejteket. Emellett világszerte folynak a beteg saját β -sejtjeinek támogatását és számuk növelését célzó

kutatások is, melyek az endogén vagy exogén elődsejtek vagy őssejtek esetleges szerepét vizsgálják a pancreas regenerációja során (Aguayo-Mazzucato C et al, 2010).

1.6.1. β -sejtek előállítása embrionális és szöveti őssejtekből

Az ES sejtek, illetve a belőlük létrehozott, korlátlan élettartamú sejtvonalak elvben ideális kiindulási anyagot jelentenének nagy mennyiségű β -sejt előállításához. Valójában azonban, ha az emberi ES sejtek izolálásával és felhasználásával kapcsolatos súlyos etikai aggályokat félre is tesszük, sok technikai probléma vár még megoldásra velük kapcsolatban (Murry CE and Keller G, 2008). Leghatékonyabb β -sejt irányú differenciáltatásuk a pancreas organogenesisének „lemásolásán” alapul. Az ES sejt tenyészeteket aktivin A és Wnt egyidejű jelenlétében mesoderma, majd a Wnt elhagyásával definitív endoderma irányába differenciáltatják. Az endodermális sejtekből cyclopamin, egy a Hedgehog morfogén rendszer működését gátló növényi alkaloida, és FGF10 segítségével a primitív előbélre jellemző sejteket hoznak létre. Ezek a sejtek retinsav hatására tovább differenciálódnak a pancreasra jellemző endodermává, illetve végül endokrin sejtekké. Az utolsó differenciáltatási lépések sikeréhez azonban szükség van a Notch rendszer gátlására is, ellenkező esetben nem az endokrin, hanem az exokrin pancreasra jellemző sejtek keletkeznek a tenyészetekben. A végső differenciáltatás hatékonysága különböző növekedési faktorok – például exendin-4, IGF-1 és/vagy HGF - hozzáadásával tovább javítható. Ezzel a módszerrel D'Amour és mtsai (D'Amour KA et al, 2006) olyan sejttenyészeteket tudtak létrehozni, amelyekben – más endokrin sejtek mellett – 7-12% volt az inzulin-termelő sejtek aránya. Az *in vitro* előállított, ES sejt eredetű β -sejtek inzulin szekréciója azonban független az aktuális glükóz koncentrációtól, tehát inkább foetális, mint érett β -sejtekként viselkednek. Immundeficiens egérbe oltva viszont érésük befejeződik, és képessé válnak a streptozotocinnal (STZ)-indukált diabetes gyógyítására (Kroon E et al, 2008). Sajnos e differenciáltatási protokoll végeredménye is csak egy kevert sejtpopuláció, amin belül kisebbségben vannak az inzulin-termelő sejtek. A nem kellően differenciálódott ES sejtek pedig teratomát képezhetnek *in vivo*. Ráadásul, mivel gyakorlatilag nulla az esélye annak, hogy az ES sejtek és a beteg testi sejtjei azonos MHC antigéneket hordozzanak, az ES sejtekből *in vitro* előállított β -sejtek is idegenek lesznek a beteg immunrendszere számára, tehát kilökődési reakciót váltanak ki. Így a recipiensek – a szerv- és sziget-transzplantált beteghez hasonlóan – folyamatos immunszuppresszív kezelésre szorulnak (Best M et al, 2008). A „szöveti

összeférhetetlenség” az IPS technika segítségével elvben kiküszöbölhető lenne, de ez a módszer jelenleg még csak kísérleti célokra alkalmas, terápiás alkalmazására a közeljövőben biztosan nem kerülhet sor (Cherry AB and Daley GQ, 2012; Puri MC and Nagy A, 2012).

Alternatív lehetőség a pancreas saját őssejtjeinek izolálása és *in vitro* tenyésztése. Ilyen, vagy inkább ilyennek vélt, „pancreas-specifikus” őssejteket azonban csak néhány laboratóriumban sikerült kimutatni. Sejttenyésztésben rendkívül nehéz őket életben tartani és egyelőre karakterizálásuk sem megoldott (Yalniz M et al, 2005). A legtöbben úgy vélik, hogy a születés után valójában már csak ún. „fakultatív őssejtek” találhatók a hasnyálmirigyben. Ezek olyan – feltehetően exokrin - sejtek, amelyek csak sérülés, vagy betegség esetén aktiválódnak. Először dedifferenciálódnak, majd osztódnak és végül pótolják az elpusztult endokrin sejteket (Seymour PA and Sander M, 2011; Yanger K and Stanger BZ, 2011). Ilyen fakultatív őssejtek mind a ductusokban, mind az acinusokban előfordulnak. A ductális sejtek esetében nem tudjuk, hogy minden epithel sejt, vagy csak egy részük az, amely exendin-4, aktivin A, és HGF egyidejű jelenlétében képes endokrin – többek között inzulin-termelő – sejtekké alakulni. Az *NGN3* gén fokozott expressziója szintén aktiválja az endokrin differenciálódási programot a ductus sejtekben. Az acinus sejteket már transzdifferentiáltatni kell ahhoz, hogy β -sejteket kapjunk. A transzdifferentiáció három gén, a *PDX1*, *NGN3*, és *MAFA* egyidejű transzdukciójával érhető el. A kapott endokrin sejtek szaporítása és végső differentiáltatása ilyenkor EGF és nikotinamid tartalmú tápfolyadékban történik (Baeyens L and Bouwens L, 2008). A pancreas fejlődésében kulcsszerepet játszó transzkripciós faktorokat kódoló gének bevitelével más, nem a pancreasból származó szöveti őssejtek is differentiáltathatók sziget-sejtek irányába. Legkönnyebben a máj hasnyálmiriggyel közös eredetű, ovális sejtjeiből lehet inzulin-termelő sejteket előállítani a *PDX1*, *NGN3*, és *NEUROD1* gének segítségével *in vitro* kultúrában. Az eljárást irányított differentiációnak nevezzük, és kisebb módosításokkal, sikerrel alkalmazták már más, nem endodermális eredetű szöveti őssejtek (például HSC-k és MSC-k) esetén is (Yechoor V and Chan L, 2010). Az irányított differentiációval létrehozott, inzulin és C-peptid pozitív sejtek azonban, ES sejtekből előállított társaikhoz hasonlóan, általában éretlen β -sejtek és *in vivo* sem mindegyikük válik teljes értékű, az aktuális glükóz szintnek megfelelő mennyiségű inzulint a keringésbe juttatni képes endokrin sejté.

1.6.2. A Langerhans-szigetek regenerációja in vivo

Az eddigi állatkísérletek alapján egyértelmű, hogy egerekben és patkányokban – az általában streptozotocin (STZ) segítségével előidézett, vagy az adott beltenyésztett törzsben (például a NOD egerekben) öröklődő - diabetes BMT-vel, legalábbis időlegesen, de néha véglegesen is, gyógyítható (Ciceri F and Piemonti L, 2010). A gyógyulás, vagy átmeneti javulás okát, a csontvelői sejtek kedvező hatásának mechanizmusát illetően azonban már erősen megoszlanak a vélemények. Ianus és mtsai (Ianus A et al, 2003) szerint például egyes, a beteg állatokba intravénásan bejuttatott csontvelői őssejtek a hasnyálmirigyben inzulin-termelő β -sejtekké transzdifferentiálódnak. Másoknak azonban, hasonló kísérleti feltételek mellett, ezeket az eredményeket nem sikerült megerősíteni. Hess és mtsai (Hess D et al, 2003) például NOD/SCID egerekben STZ kezeléssel indukáltak diabetest, majd szubletális besugárzás után csontvelői magvas sejtekkel, vagy a csontvelőből izolált HSC-kkel oltották a beteg állatokat. A következő négy hétben mind a teljes csontvelővel, mind a szeparált HSC-kkel transzplantált egerekben jelentősen csökkent a vércukorszint. Az állatok hasnyálmirigyének össztömege és inzulin termelése növekedett, a Langerhans-szigetekben azonban nem tudtak kimutatni donor eredetű sejteket. A pancreas regenerációját – a szerzők szerint – a recipiens állat β -sejtjeinek intenzív osztódása biztosította. Ma már a legtöbb kutató úgy véli (Lee RH et al, 2006), hogy a csontvelői őssejt(ek) (HSC-k és/vagy MSC-k) transzplantációjuk után olyan trofikus faktor(oka)t termelnek a beteg állatok szervezetében (ld: az 1.4.-ben), amely(ek) biztosítják az endogén β -sejtek, vagy prekursoraik osztódását és a Langerhans-szigetek regenerációját. A hasnyálmirigy esetében ilyen - az őssejtek által termelt – faktorok a HGF (Izumida Y et al, 2005; Mellado-Gil J et al, 2011; Flaquer M et al, 2012), az IGF-1 (Agudo J et al, 2008), a PDGF (Chen H et al, 2011), és a PGE2 (Vennemann A et al, 2012). A regenerációhoz szükséges fokozott sejtosztódás és differentiálódás egyik fontos előfeltétele az érintett terület oxigén- és tápanyagellátásának javítása, új kapillárisok képződése. A csontvelői - elsősorban a mesenchymalis – őssejtek ezt a folyamatot is segítik (Hess D et al, 2003; Bell GI et al, 2012a; 2012b). A donor eredetű szöveti őssejtek tehát elsősorban ilyen, közvetett mód(ok)on vesznek részt a Langerhans-szigetek regenerációjában.

A kérdés az, hogy honnan erednek az őssejt kezelés hatására megjelenő új β -sejtek. Az egyik forrás a még életképes β -sejtek osztódása lehet. Ennek köszönhetően fiatal rágsálókban rövid idő alatt akár harmincszorosára is nőhet az inzulin-szekretáló sejtek

száma a hasnyálmirigyben. Idős (>1 éves) egerekben viszont 1400 β -sejtből már csak egy osztódik minden 24 órában, vagyis a β -sejtek proliferációs képessége az életkor előrehaladtával csökken. Emberben azonban fiatal korban sem számolhatunk jelentős β -sejt osztódással. Bár a β -sejt massa fiziológias körülmények között (például terhesség alatt, vagy elhízáskor) nőhet, de ennek maximális mértéke csak 30-40%-os és vitatott, hogy ebben van-e egyáltalán szerepe a sejtosztódásnak, vagy inkább hipertrófiáról van szó. (Egy 5 éves gyermek pancreasban az osztódó β -sejtek aránya kevesebb mint 0,2%, felnőttek hasnyálmirigy szigeteiben pedig már nem is lehet osztódó β -sejteket kimutatni) (Bonner-Weir S et al, 2010; Rieck S and Kaestner KH, 2010). Emberben tehát a pancreas regenerációja elsősorban az inzulin-termelő sejtek neogenezisén, nem pedig az érett β -sejtek osztódásán alapulhat (Gianani R, 2011). A neogenezis a korábban már említett „fakultatív őssejtekből” - elsősorban ductalis epithel sejtekből és esetleg acinus sejtekből – indulhat ki (Puri S and Hebrok M, 2010). Azonban bármi is a HSC-k és/vagy MSC-k által elindított pancreas regeneráció konkrét mechanizmusa, a jelenlegi terápiás próbálkozások jórészt ezen a jelenségen alapulnak.

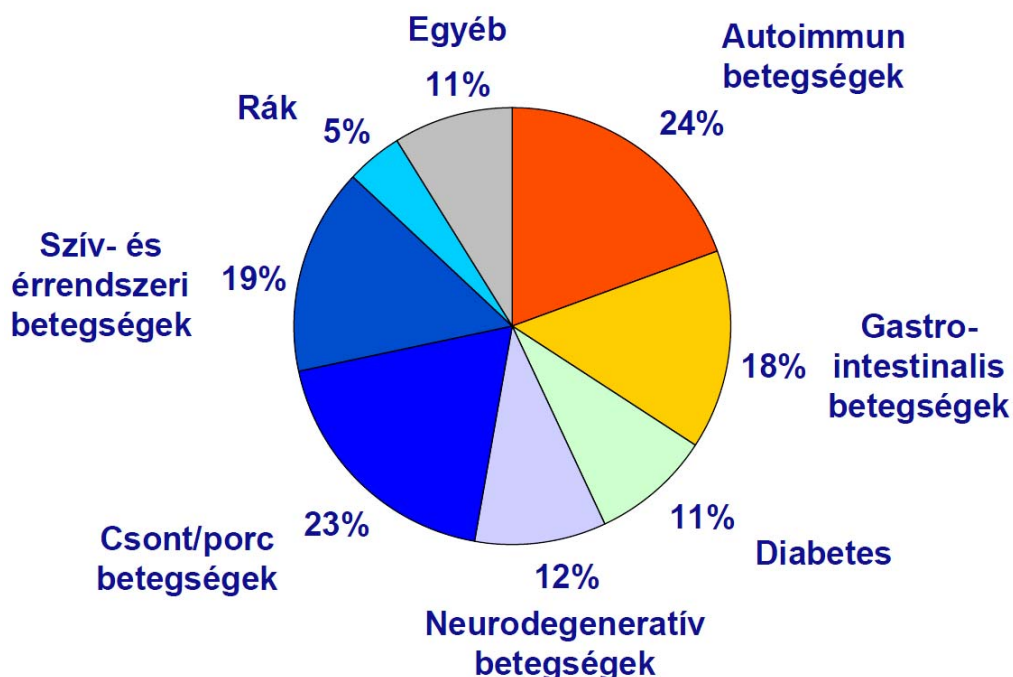
Az 1-es típusú diabetes gyógyításához azonban nem elég az elpusztult β -sejtek pótlása. Ha nem sikerül egyidejűleg az autoimmun folyamatot is megállítani, a hibásan működő immunrendszer az újonnan keletkezett inzulin-termelő sejteket is elpusztítja. Éppen ezért különösen ígéretes az MSC-k alkalmazása ezen a területen, hiszen nem csak a hasnyálmirigy regenerációját tudják elindítani, hanem – egyidejűleg – immunszuppresszív aktivitásuk (ld: 1.5.) révén a további károsodástól is megvédhetik a pancreast. Madec és mtsi (Madec AM et al, 2009) például kimutatták, hogy allogén csontvelői MSC-k adása után fiatal NOD egerekben megnő a Treg sejtek mennyisége, ami jelentősen késlelteti a diabetes kialakulását. Egyidejűleg az immunválaszt segítő, $CD4^+$ T lymphocyta arányának a Th2-es sejtek irányába történő eltolódását is megfigyelték (Fiorina P et al, 2009). Hasonló eredményt kaptak, amikor zsírszövet eredetű MSC-kkel kezeltek már cukorbeteg, felnőtt állatokat. Átmenetileg csökkent a vércukor szint, a pancreasban kevesebb infiltráló gyulladásos sejtet lehetett kimutatni, a szigetek környékén és a vérben mérséklődött az $IFN-\gamma$, viszont nőtt a $TGF-\beta$ koncentrációja (Montane J et al, 2011; Bassi EJ et al, 2012). Kongenikus csontvelői MSC-kkel kezelt NOD állatokban az autoreaktív T-sejtek proliferációs képességének és az autoantigént bemutató DC-k számának csökkenését figyelték meg (Jurewicz M et al, 2010).

1.7. A mesenchymalis őssejtek terápiás alkalmazásának lehetőségei és korlátai - kitekintés

Számos – a disszertációban is tárgyalt munka igazolta, hogy az MSC-k allogén, sőt néha xenogén recipiensbe oltva sem váltanak ki erőteljes, a sejtek kilökődésével járó immunválaszt, azaz hipoimmunogének. Egy beteg kezeléséhez tehát nincs szükség feltétlenül autológ őssejtekre, elvben bármely egészséges donor MSC-je felhasználható anélkül, hogy gyógyszerekkel gátolnánk a recipiens immunrendszerének működését. Ha ez valóban így van, akkor létre lehet hozni olyan „MSC-bankokat”, amelyekből bármikor hozzájuthatunk azonnal felhasználható, lefagyasztott sejtekhez. Nincs tehát szükség hosszadalmas és drága donorkeresésre akkor sem, ha valamiért nem juthatunk autológ sejtekhez, vagy ezek alkalmatlanok terápiás célra (például a betegséget éppen az MSC-k elégtelen, vagy hibás működése okozza). Az MSC-k és az immunrendszer viszonya tehát különleges, ami valószínűleg a következő okokra vezethető vissza: (i) az *in vitro* kultúrában tenyésztett MSC-k viszonylag kevés első osztályba tartozó MHC-antigént hordoznak a felszínükön, MHC-II-es antigéneket és kostimulátor molekulákat (CD40, CD80, CD86) pedig egyáltalán nem expresszálnak; (ii) az IFN- γ -val stimulált MSC-k felszínén megnő ugyan az MHC-I-es molekulák száma, sőt MHC-II-es antigének is kifejeződnek rajtuk, kostimulátor molekulákat azonban ilyenkor sem expresszálnak; tehát (iii) valószínűleg professzionális antigén-bemutató sejt-ként sem funkcionálhatnak, bár ez – mint korábban már említettük – nem feltétlenül igaz (Chamberlain G et al, 2007; Ben-Ami E et al, 2011).

2004-ben Le Blanc és mtsai (Le Blanc K et al, 2004) a „*The Lancet*” című folyóiratban számoltak be az első, az MSC-k *in vivo* gyulladásgátló és immunszuppresszív hatásán alapuló sikeres terápiás beavatkozásról. Egy 9 éves, akut lymphoid leukaemiája miatt allogén csontvelő-transzplantációval kezelt kisfiúban rendkívül súlyos (IV. stádium), a bőrt, az emésztőrendszert és a májat is érintő – steroid rezisztens – *akut graft versus host betegség* (aGVHD) alakult ki. Ezt sikerült leküzdeni a gyermek édesanyjából (haploidentikus donor) származó MSC-k ismételt intravénás adásával. 2012 tavaszán a *ClinicalTrials.gov* honlapon már több mint 200, jórészt allogén MSC-k felhasználásán alapuló klinikai „trial” adatait lehetett megtalálni. Mint a 10. ábra mutatja, elsősorban olyan betegségek kezelése során próbálkoznak MSC-k adásával, amelyekben egyidejűleg van szükség az elpusztult sejtek/szövetek pótlására, valamint a károsodást kiváltó (vagy kísérő) gyulladás és autoimmun folyamatok gátlására. Hangsúlyozni kell azonban, hogy a vizsgálatok döntő zöme még csak az I-es, legfeljebb I/II-es fázisban van, célja tehát nem

elsősorban a gyógyítás, hanem a kezelés biztonságos voltának igazolása. Alig néhány – az aGVHD megelőzését és a már kialakult betegség visszaszorítását, valamint néhány autoimmun betegség (Crohn-betegség, rheumatoid arthritis) kezelését célzó – „trial” jutott el a III. fázisba. Néhány biztató eredménytől eltekintve tehát az eddigi vizsgálatok elsősorban azt igazolják, hogy az MSC kezelésnek (legalábbis rövidtávon) nincs káros mellékhatása (Dazzi F and Krampera M, 2011; Hao L et al, 2012).



10. ábra. A mesenchymalis őssejtek terápiás alkalmazását célzó klinikai kísérletek százalékos megoszlása különböző betegcsoportok között (2012 június, a „ClinicalTrials.gov” honlap alapján).

A pozitív eredmények ellenére sem feledkezhetünk meg arról, hogy számos, potenciálisan a betegek egészségét, sőt akár életkilátásait is érintő kérdést kell még tisztázni, mielőtt az „MSC-terápia” széles körű alkalmazására sor kerülhet.

A legfontosabb kérdések, amiknek a megválaszolása túlmutat nemcsak e dolgozat, de egyelőre az orvostudomány határain is, a következők:

- Valóban olyan alacsony az MSC-k immunogenitása, hogy bármilyen beavatkozás elvégezhető allogén őssejtekkel is? Más szóval reális egy minden beteg számára rendelkezésre álló MSC bank létrehozása?

- Okozhatnak-e a mesenchymalis őssejtek daganatot a szervezetben, vagy gyorsíthatják-e a recipiensben esetleg már kialakult, de még nem diagnosztizált tumorok növekedését és metastasis képzését?
- Különösen lokális adásuk után nem képeznek-e ektopikus – az érintett szerv működését megzavaró - szöveteket?
- Indukálhatnak-e fibrosist olyan életfontosságú szervekben, mint a tüdő vagy a vese?

Amíg a fenti kérdésekre nem tudunk választ adni, addig nem várható komoly előrelépés az MSC-k terápiás alkalmazásában (Ankrum J and Karp JM, 2010; De Migual MP et al, 2012).

2. Célkitűzések helyett – „*in medias res*”

A bevezetőben vázlatos áttekintést szerettem volna nyújtani mindarról, amit ma az MSC-kről tudunk. (A feldolgozás határait jelzi, hogy a „*mesenchymal stem cells*” kifejezésre 2012 júliusában a *PubMed* adatbázis 18 114 találatot jelzett). Az olvasóban mégis joggal támadhat komoly hiányérzet. Felmerül a kérdés, hogy mit is tudunk valójában ezeknek a - szinte minden szervünk stroma-állományában előforduló - multipotens szöveti ős- vagy elődsejteknek a biológiájáról? Tisztázásra vár például, hogy:

- honnan erednek, vagyis az egyedfejlődés során mikor, hol és milyen sejttypus(ok)ból alakulnak ki az MSC-k;
- mi az MSC-k tényleges funkciója *in situ*;
- eltérő-e a különböző szervekben/szövetekben található MSC-k regeneratív és immunmoduláló képessége;
- befolyásolják-e – és ha igen, akkor hogyan és milyen mértékben - a gyulladásos folyamatok az MSC-k regeneratív képességét?

Az elmúlt közel tíz évben ezeknek a kérdéseknek néhány aspektusát vizsgáltuk laboratóriumunkban. Eredményeinket – erősen rövidített formában - a következő fejezetekben foglalom össze. Jelentőségüket elsősorban abban látom, hogy az előző, 1.7. fejezet végén felvetett, inkább gyakorlati kérdések mellett, az MSC-k eredetének és tényleges biológiai szerepének megismerése is nagyban hozzájárulhat célzottabb, és így eredményesebb terápiás eljárások kidolgozásához.

3. Anyagok és módszerek

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleti állataink mindkét nembeli, 14 napos és fiatal felnőtt (8-12 hetes) C57Bl/6 (H-2^b), Balb/c (H-2^d), (C57Bl/6xDBA/2)F1 (Országos Onkológiai Intézet, Budapest), valamint CD1 (Charles River Laboratories, Wilmington, MA, USA) egerek voltak. Az EGFP transzgenikus CD1 állatokat (Hadjantonakis AK et al, 1998) Nagy András (Mount Sinai Hospital, Toronto, ON, Kanada) bocsátotta rendelkezésünkre.

3.2. *In vitro* módszerek

3.2.1. *Egér mesenchymalis stroma sejtek szeparálása és tenyésztése*

Az MSC-k izolálását a Peister és mtsai (Peister A et al, 2004) által leírt módszerrel végeztük. A egerek femurjainak és tibiáinak a velőűrét hideg Hanks-féle oldattal (HBSS, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) átmostuk, majd – egy további mosás után - komplett tenyésztőfolyadékban felfuszpendáltuk őket. A hasi és lágyéki tájékról származó zsírszövet mintákat hideg foszfáttal-pufferelt sóoldatban (PBS) mostuk, daraboltuk, és 0.1% kollagenáz (Sigma-Aldrich, St.Louis, Mo, USA) tartalmú PBS-ben, 37°C-on emésztettük 30 percen át. Az érett zsírsejteket és a kötőszöveti elemeket 8 perces (600 rpm) centrifugálással távolítottuk el, majd a kapott üledéket (ún. SVF = stroma vasculáris frakció) komplett médiumban reszuszpendáltuk. A 14 napos állatok thymusát, lépét és aortáját mechanikailag tártuk fel, a kinyert sejteket HBSS-ben mostuk, majd ezeket is komplett tenyésztőfolyadékban vettük fel. A – tenyésztéshez is használt - komplett tápfolyadék a Dulbecco által módosított Eagle-féle médium (DMEM) és Ham-féle F-12 médium 1:1 arányú keveréke volt, 10% (v/v) foetalis borjú savóval (FCS), 5% (v/v) lósavóval (HS), 2 mM L-glutammal (mind Invitrogen), 50 U/ml penicillinnel, és 50 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich) kiegészítve. A különböző eredetű sejteket 10^5 - 2×10^5 sejt/cm² sűrűségben 25 cm²-es (T25) tenyésztőedényekbe (BD Falcon, Bedford, MA, USA) szélesztettük. A kultúrákat 37°C-os CO₂-termosztátban tartottuk. A le nem tapadt sejteket a médium heti kétszeri cseréjével távolítottuk el. 2-4 hét után a közel összefüggő, adherens sejtréteget hideg HBSS oldattal mostuk, majd 0.25%-os tripszin/EDTA (Sigma-Aldrich) oldattal választottuk el a tenyésztőedény falától. Újabb mosás (HBSS) után 75 cm²-es (T75) flakóban (BD Falcon), heti kétszeri tápfolyadék cserével folytattuk a stroma sejtek tenyésztését. A további átoltások ugyanígy történtek. Kísérleteinket 8-15-ször átoltott MSC-kkel végeztük.

3.2.2. Egér vérképző ősz- és elődsejtek dúsítása és tenyésztése

Az egér comb- és lábszárcsontokból nyert (ld. fent) sejtszuspenziót HBSS-ben mostuk, centrifugáltuk (8 perc, 1200 rpm), majd az üledékhez 5 ml, 0,01 M TRIS (tris-hydroxymethyl-amino-metan) és 8,3 g/l ammónium-klorid oldatát adtuk. Öt perces, szobahőn történt inkubálás és újabb mosás után az immár vörösvérsejtmentes leukocytákhoz biotinnal jelölt monoklonális anti-CD3ε, anti-CD45R/B220, anti-CD11b, anti-Ly-6G, és anti-TER-119 ellenanyagok keverékét (Mouse Lineage Panel, BD Pharmingen, San Diego, CA, USA) adtuk. Fél órás, 4°C-on történt inkubálás után a felesleges – nem kötött – ellenanyagokat kétszeri mosással eltávolítottuk és a sejteket streptavidinnal fedett mágneses gyöngyökkel (BioSource, Camarillo, CA, USA) kevertük össze. Újabb fél órás, 4°C-on történt inkubálás után a szabad gyöngyöket, valamint azokat a sejteket, amelyeknek felszínéhez a különböző vérsejtfejlődési markerekre specifikus ellenanyagokkal fedett gyöngyök kitapadtak, egy erős mágnes (Polar Bear Magnet, BioSource) segítségével eltávolítottuk a rendszerből. A mágneses depléciót megismételtük és így nyertük a kísérleteink során felhasznált, Lin⁻ sejtfракciót, amely áramlási cytometriás vizsgálatok szerint <5% Lin⁺ sejtet tartalmazott.

A nem szeparált, illetve a Lin⁻ vérképző sejtekből stromasejtmentes kultúrákat készítettünk 96-llyukú, „U”-aljú tenyésztőtálcákon (BD Falcon). A tápfolyadék 10% (v/v) FCS-t, 2 mM L-glutamint és antibiotikumokat tartalmazó αMEM (Invitrogen) volt, 100 ng/ml rekombináns SCF-el, 100 ng/ml Flk-2/Flt-3 ligandummal és 50 ng/ml TPO-val (mind R&D Systems, Inc., Minneapolis, MN, USA) kiegészítve. A további vizsgálatra szánt sejteket a tenyésztés 7. és 14. napján arattuk le. Utóbbi esetben a 7. napon fél médium csere történt a citokinek eredeti koncentrációban való pótlásával.

3.2.3. Emberi mononukleáris sejtek és mesenchymalis stroma sejtek szeparálása és tenyésztése

Az emberi csontvelő mintákat (2-10 ml mennyiségben) ortopédsebészeti műtéten átesett, balesetet szenvedett, illetve krónikus betegek combfejéből nyerték az SE Ortopédiai Klinikáján és a Budai Irgalmasrendi Kórház Ortopédiai Osztályán. Az myelodysplasiás (MDS) betegek esetében a cytogenetikai vizsgálat céljából végzett sternum punkcióból származó sejtek egy részét bocsátották a rendelkezésünkre (SE, III. sz. Belgyógyászati Klinika). A zsírszövet minták (20-50 ml) az Országos Onkológiai Intézetben – rekonstrukciós sebészeti célból leszívott és a beavatkozás során fel nem használt – zsírszövet maradékokból származtak (az etikai engedély száma: 12988-60/2003-

1018EKU). A betegek a mintavételhez a Helsinki deklarációnak megfelelően beleegyező nyilatkozatukat adták.

A csontvelő mintákból Lymphoprep (Nycomed Pharma, Oslo, Norvégia) sűrűség (1,077 g/ml) gradiensen szeparáltuk a mononukleáris sejteket, majd T25-ös tenyésztőflaskában (BD Falcon) inkubáltuk őket 37°C-on, CO₂-termosztátban, 10% (v/v) FCS-t (Invitrogen), 2 mM L-glutamint, 50 U/ml penicillint és 50 µg/ml streptomycint (Sigma-Aldrich) tartalmazó DMEM (Invitrogen) médiumban. A le nem tapadt (non-adherens) sejteket három nap múlva eltávolítottuk az edényekből és a tenyészeteket heti két alkalommal friss tápfolyadékkal láttuk el. A stroma sejt réteg kb. 2-4 hét alatt vált összefüggővé, ekkor hideg HBSS-el történt mosás után 0.25%-os tripszin/EDTA (Sigma-Aldrich) oldattal felszedtük a tenyésztőedény falához tapadt (adherens) sejteket, majd 1:2 - 1:5 arányban hígítva átoltottuk őket egy nagyobb, T75-ös tenyésztőflaskákba (BD Falcon). Az emberi stroma sejt kultúrák a harmadik átoltás után vérképző elemeket már nem tartalmaznak, így tiszta MSC kultúrának tekinthetők. Kísérleteinket 3-7-szer átoltott MSC-kkel végeztük.

A leszívott zsírszövet mintákból – a 3.2.-ben egér MSC-kkel kapcsolatban leírtakhoz hasonlóan - 0.1% kollagenáz enzimmel végzett emésztés után nyertük ki a magvas sejteket tartalmazó ún. stroma vasculáris frakciót (SVF). Az SVF-ben található MSC-eket a továbbiakban az emberi csontvelőből izolált adherens sejtekkel azonos módon és körülmények között – 10% (v/v) FCS-t tartalmazó DMEM-ben – izoláltuk és tenyésztettük.

A humán csontvelő minták 15, ismert gyulladásos, vagy hematológiai betegségben nem szenvedő (8 nő, 7 férfi, kor: 28-79 év), 7 RA-s (5 nő, 2 férfi, kor: 48-71 év), 7 OA-s (4 nő, 3 férfi, kor: 41-69 év), és 10 MDS (3 nő, 7 férfi, kor: 51-90 év) betegből származtak. Emellett 28 páciens (26 nő, 2 férfi, kor: 17-75 év) zsírszövetéből izoláltunk MSC-eket.

3.2.4. A mesenchymalis őssejtek adipocyta, osteoblast, és chondrocyta irányú differenciálata

Az egér és a humán MSC-k adipocyta és osteoblast irányú differenciálataát egyaránt Pittenger és mtsai (Pittenger MF et al. 1999) módszerével végeztük. A konfluens sejtenyészeteket egér eredetű sejtek esetén 7, illetve humán eredetű sejtek esetén 14 napig inkubáltuk 10% (v/v) FCS-t (Invitrogen), 10⁻⁷ M dexamethazont, 0,5 mM 3-izobutil-1-metilxanthint (IBMX), 100 IU penicillint és 50 µg/ml streptomycint (mind Sigma-Aldrich) tartalmazó DMEM/F12 (Invitrogen) médiumban, majd a zsírsejtekben felhalmozódott

lipidcseppeket olajvörös festéssel (Oil Red O, Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá. Az osteogén médium 10% (v/v) FCS-t, 2mM L-glutamint, 10^{-8} M hydrocortisont, 10mM β -glycerophosphatot, 50 μ g/ml aszkorbinsavat (Sigma-Aldrich), 100 IU penicillint és 50 μ g/ml streptomycint tartalmazó DMEM volt. Két hét elteltével az extracelluláris mátrixban lerakódott kalciumot alizarinvörös (Alizarin Red S, Sigma-Aldrich) festéssel mutattuk ki.

Az *in vitro* chondrogenesis tanulmányozására egy új „micromass” kultúrát fejlesztettünk ki, amely hasonló, de nem azonos a 2005-ben leírt Penick-féle módszerrel (Penick KJ et al, 2005). A sejteket 96-lyukú, „U”-aljú tenyésztőtálcákon (BD Falcon) szélesztettük (2×10^5 sejt/lyuk/200 μ l végtérfogat), 1200 rpm-el 10 percig centrifugáltuk („micromass pellet”), majd 14 napig 10% (v/v) FCS-t, 5 ng/ml rekombináns TGF- β 3-at (R&D Systems), 6 μ g/ml inzulint és 10^{-7} M dexamethasont (Sigma-Aldrich) tartalmazó DMEM/F12 médiumban inkubáltuk őket. Az extracelluláris mátrixban felhalmozódott szulfatált glükózaminoglikánokat 1%-os 1,9-dimetil-metilénkék (Sigma-Aldrich) festéssel tettük láthatóvá.

A készítményekről Olympus CK2-es inverz mikroszkópban (Olympus Optical Co., Tokió, Japán), Nikon Coolpix 4500 digitális kamera segítségével (Nikon GmbH, Düsseldorf, Németország) készítettünk felvételeket.

3.2.5. Kolóniaképző sejtek vizsgálata lágy-gél kultúrában

Az egér és a humán granulocyta-macrophag (CFU-GM), erythroid (BFU-E), valamint granulocyta-erythrocyta-megakaryocyta-macrophag (CFU-GEMM) kolóniaképző sejtek gyakoriságát metilcellulóz alapú lágy-gél kultúrákban határoztuk meg. A megfelelő citokineket tartalmazó MethoCult GF M3434 (egér) és MethoCult GF H4434 (humán) Kit-eket a Stem Cell Technologies cégtől (Vancouver, Kanada) vásároltuk és a gyártó utasításainak megfelelően alkalmaztuk őket. A kolóniákat 9, illetve 14 napos tenyésztés után Olympus CK2-es inverz mikroszkópban számoltuk.

3.2.6. „Macskakő” kolóniát képző sejtek tenyésztése

Friss egér és humán csontvelő mintákból 96-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon (BD Falcon) vérképzést támogató stroma réteget hoztunk létre 12,5% (v/v) FCS-t, 12,5% (v/v) HS-t, 3,5 mM HEPES-t, 2 mM glutamint, 10^{-4} M β -merkaptotetanolt, 10^{-6} M hidrokortizont és antibiotikumokat tartalmazó ún. CAFC médiumban. Amikor a stroma réteg elérte a konfluenciát, akkor – megakadályozandó a stroma sejtek további osztódását -

15 Gy-vel besugároztuk a tálcákat. A vizsgálandó sejtek különböző – előkísérletekben meghatározott - hígításait 24-36 lyukba pipettáztuk (limitált hígítás), majd 33°C-os CO₂-termosztátban inkubáltuk a mintákat. A stroma réteg alatt növekedő „macskakő” kolóniákat nem tartalmazó lyukakat minden héten leszámoltuk Olympus CK2-es inverz mikroszkópban. A CAFC gyakoriságokat és a szignifikancia értékeket ($p < 0,05$) az L-Calc szoftver (Stem Cell Technologies) segítségével számítottuk ki.

3.2.7. A kemotaxis és transzendotheliális migráció vizsgálata

A vérképző ős- és elődsejtek kemotaxisának és transzendotheliális migrációs képességének vizsgálatát 24 lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon (BD Falcon) végeztük, 12 mm átmérőjű, 3 µm-es pórusokkal ellátott Millicell-betétek (ún. *insert*-ek) (Millicell-PCF, Millipore Co., Cork, Írország) segítségével. A transzendotheliális migrációs kísérletekben a szükséges összefüggő endothel réteget KS-IMM sejtekből (egy Kaposi-szarkóma eredetű, CD31, CD34, vWF és c-Kit pozitív sejtvonal, amit Dr. Tóvári József, OOI, Budapest, bocsátott a rendelkezésünkre) alakítottuk ki. A kísérlet napján 10⁶ frissen preparált csontvelői magvas sejtet helyeztünk a betétekbe 400 µl, 10% (v/v) FCS-t tartalmazó DMEM médiumban, Gal-1-gyel vagy anélkül, a lyukakba pedig 600 µl, 100 ng/ml rekombináns SDF-1-et (R&D Systems) tartalmazó tápfolyadék került. 4 - 6 óra, 37 C°-on, CO₂-termosztátban történő inkubálás után az üres (kemotaxis), illetve endothel sejtekkel borított (transzmigráció) szűrőkön keresztül vándorolt sejteket megszámloltuk, mostuk, és lágy-gél kultúrában (ld. 3.2.5.) meghatároztuk kolóniaképző képességüket.

3.2.8. T-sejt proliferáció és gátlása

A mitogén- és alloantigén-indukált T sejt osztódás gátlását 96-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon (BD Falcon) vizsgáltuk. Az MSC-eket az „Eredmények” című részben feltüntetett számban, 100µl komplett médiumban tapasztottuk ki a tálcák felületéhez. 24 óra elteltével a nem adherens sejteket lemostuk és minden lyukhoz 2x10⁵ lépsejtet, vagy a lépből izolált T-sejtet adtunk 200 µl végtérfogatban, 5 µg/ml concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich) egyidejű jelenlétében, vagy ConA nélkül. A T-sejtek tisztítását SpinSep Mouse T Cell Enrichment Kit-el (StemCell Technologies Inc), a cég utasításait követve végeztük. A kevert lymphocita kultúrákat (MLR) hasonló körülmények között, 2x10⁵ „responder” (C57Bl/6) és 2x10⁵ „stimulátor” (30 Gy-jel besugárzott Balb/c) lépsejt összemérésével, szintén az „Eredmények” című részben feltüntetett számú MSC

jelenlétében készítettük. A mitogénnel stimulált kultúrák esetében két, a kevert lymphocytá kultúrák esetében négy nap elteltével $1\ \mu\text{Ci}\ ^3\text{H}$ -timidint (Amersham Pharmacia Biotech Export GmbH, Bécs, Ausztria) adtunk a kultúrákhoz. 6-12 órás jelölődés után a tálcákat learattuk és folyadékszintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot (cpm).

Az antigén specifikus T-sejt proliferációt Horowitz és mtsai (Horwitz MS et al, 2002) módszerével mértük. Az antigén-bemutó sejteket (APC) kezeletlen kontroll és STZ kezelt nőstény C57Bl/6 egerek lépéből nyertük (az STZ kezelt egereknél a kezelés megkezdése utáni 8. napon). A vörösvérsejt-mentesített (ld. 3.3.2.), majd 10% (v/v) FCS-t tartalmazó DMEM médiumban reszuszpendált lépsejteket (10^7 sejt/ml) 12 cm átmérőjű Petri-csészékben (BD Falcon) 37°C -on inkubáltuk. Négy óra elteltével a le nem tapadt sejteket többszöri hideg PBS-es mosással eltávolítottuk, a letapadt sejteket pedig kaparóval (Cell Scraper, BD Falcon) felszedtük. 15 Gy-jel történt besugárzás után ezeket az „adherens” sejteket használtuk APC-kként. A T-lymphocytákat STZ kezelt állatok hasnyálmirigyéből, ill. ovalbuminnal (OVA) immunizált egerek (állatonként $100\ \mu\text{g}$ OVA $\text{Al}(\text{OH})_3$ -ban, ip) lépéből a SpinSep Mouse T Cell Enrichment Kit (ld. fent) segítségével szeparáltuk. Az APC-eket (5×10^4 sejt/lyuk) és a T-sejteket (2×10^5 sejt/lyuk) 96 lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon, szolubilis antigének (hasnyálmirigy szövet extraktum, vagy OVA) jelenlétében, illetve hiányában, 72 órán át 37°C -on inkubáltuk, majd lyukanként $1\ \mu\text{Ci}\ ^3\text{H}$ -timidint adtunk a kultúrákhoz. További 18 órás inkubálás után learattuk a tálcákat és folyadékszintillátorban lemértük a mintákat.

3.3. *In vivo* módszerek

3.3.1. *Csontvelő transzplantáció*

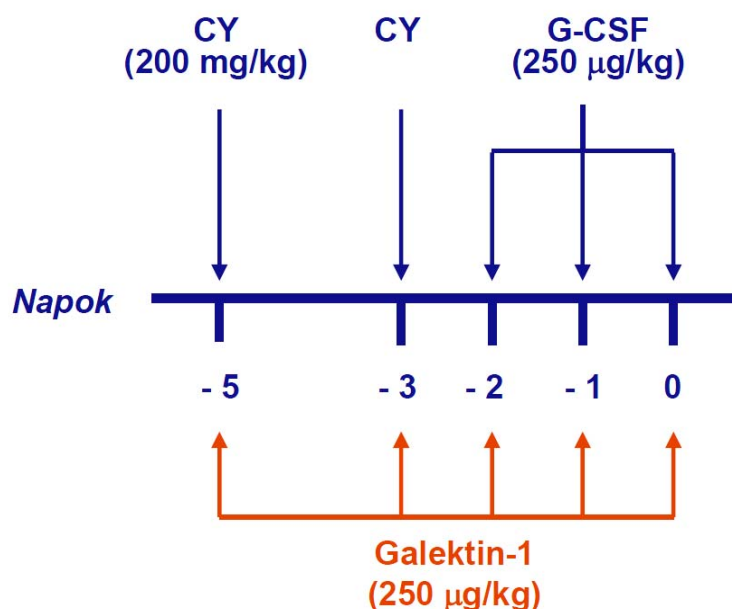
Felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6, vagy (C57Bl/6xDBA/2)F1 egereket $900\ \text{cGy}$, $80\ \text{cGy/perc}$ intenzitású, ^{137}Cs -forrásból származó γ -sugárzással (Országos Frédéric Joliot-Curie Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Intézet, Budapest) történt egésztest besugárzást követően intravénásan oltottunk 10^6 frissen szeparált csontvelői magvas sejttel, vagy 50 , ill. $100\ \mu\text{l}$ - mobilizáción átesett állatokból származó - alvadásgátolt vérrel.

Az *in vitro* tenyésztet HSC-k tartós repopulációs képességének vizsgálatakor a besugárzott nőstény recipienseket 800 , illetve 4000 , hím donorból származó vizsgálandó sejttel és – egyidejűleg - 2×10^5 , nőstény egerekből izolált „legyengített” csontvelői magvas sejttel transzplantáltuk. A „legyengített” csontvelői sejteket ugyanazon *graft* sorozatos (2-

3-szori) transzplantációjával állítottuk elő. Az állatok sorsát, illetve a kimerizmus alakulását a BMT után 3-6 hónapig kísértük figyelemmel.

3.3.2. A vérképző ősz- és elődsejtek mobilizációja

A mobilizációs eljárás lényegét az 11. ábrán foglaltuk össze. Az egerek a 0. és 2. napon 200 mg/testsúly kg (állatonként ~ 3-4 mg) ciklofoszfamidot (Cy) (Cytosan, Bristol-Meyers Squibb, Baar, Svájc) kaptak intraperitoneálisan (ip), majd minden ezt követő napon 250 µg/kg (~5 µg/egér) humán rekombináns G-CSF-et (Neupogen, F Hoffman-La Roche, Basel, Svájc) subcutan (sc) injekcióban. A Gal-1-el végzett kísérletek során a lektint 250 µM β-merkaptóetanolt (Sigma-Aldrich) tartalmazó PBS-sel hígítottuk a kívánt koncentrációra és a Cy-dal, illetve G-CSF-fel párhuzamosan, naponta adtuk az állatoknak.



11. ábra. A vérképző ősz- és elődsejtek mobilizációja. A mobilizációt gátló galektin-1 adagolását az ábrán pirossal jelöltük.

3.4. Analitikai és preparatív módszerek

3.4.1. Áramlási citometria

Az egér és humán vérképző sejtek, valamint MSC-k sejtfelszíni markereit FITC-el, vagy PE-el jelzett, illetve biotinnal konjugáltatott monoklonális ellenanyagok segítségével mutattuk ki. A felhasznált antitesteket – amiknek listáját a 6. táblázatban foglaltuk össze - a BD Pharmingen cégtől vásároltuk. Mintánkét $2-5 \times 10^5$ sejtet jelöltünk a megfelelő

monoklonális ellenanyaggal, majd a 20 perces, 4°C-on történt inkubálás és háromszori mosás után a biotinált antitestekkel jelölt sejtekhez második reagensként PE-nel konjugáltatott streptavidint (Sigma-Aldrich) adtunk. Ezt újabb 20 perces inkubálás és mosás követte 4°C-on. A méréseket FACScan áramlási citométerrel végeztük és az eredményeket a Cell Quest szoftver (Becton-Dickinson, Mountain View, CA, USA) segítségével értékeltük.

6. táblázat. Az áramlási citometriás mérések során felhasznált monoklonális antitestek

Anti-egér ellenanyagok			Anti-humán ellenanyagok		
<i>Jelölés</i>	<i>Izotípus</i>	<i>Antigén</i>	<i>Jelölés</i>	<i>Izotípus</i>	<i>Antigén</i>
PE	Patkány IgG2a	Sca-1	FITC	Egér IgG2b	CD44
PE	Patkány IgG2b	CD44	PE	Egér IgG1	CD73
PE	Patkány IgG2a	CD73	PE	Egér IgG1	CD90
FITC	Patkány IgG2b	CD90.2	FITC	Egér IgM	CD105
FITC	Patkány IgG2a	CD34	PE	Egér IgG1	CD34
PE	Patkány IgG2a	Flk-1	FITC	Egér IgG1	CD45
PE	Patkány IgG2a	CD31			
Biotin	Patkány IgG2b	CD117			
Biotin	Patkány IgG2b	CD119			
Biotin	Hörcsög IgG1	CD3ε			
Biotin	Patkány IgG2b	CD45/B220			
Biotin	Patkány IgG2b	CD11b			
Biotin	Patkány IgG2b	Ly-6G			
Biotin	Patkány IgG2b	TER-119			
Biotin	Patkány IgG2b	I-A/I-E			

3.4.2. Rekombináns Jagged-1 fehérje és galektin-1 előállítása

A Jagged-1 fehérje extracelluláris doménjének (sJG1^{ECD}) megfelelő cDNS szakaszt tartalmazó pUSEamp plazmidot az Upstate Biotechnology (Lake Placid, NY, USA) cégtől vásároltuk. A vektort LipofectAmineTM Plus reagens (Invitrogen) segítségével juttattuk be 10% (v/v) FCS-t tartalmazó DMEM médiumban tenyésztett COS7 sejtekbe. Három óra

elteltével lecseréltük a médiumot és a 3., 5., és 7. napon lefagyasztottuk a transzfektált sejtek felülúszóit. Az összegyűjtött felülúszókból poliklonális nyúl anti-Jagged-1 ellenanyaggal (Sigma-Aldrich) fedett Sepharose-4B (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Svédország) affinitás-oszlopon izoláltuk a rekombináns sJG1^{ECD} fehérjét, amelynek tisztaságát Western-blotton ellenőriztük. Multivalens Jagged-1 ligandumot úgy állítottunk elő, hogy brómciánnal aktivált Sepharose-4B gyöngyöket fedtünk a tisztított, rekombináns fehérjével.

A rekombináns galektin-1-et Dr. Monostori Éva és mtsai (MTA, SZBK, Genetikai Intézet) állították elő (Fajka-Boja R et al, 2002). A Gal-1 fehérje cDNS-ét a Teikyo egyetemen (Japán) Dr. Jun Hirabayashi és Ken-Ichi Kasai izolálták. A szegedi laboratóriumban a pQE-60 expressziós vektorba (Qiagen, Valencia, CA, USA) klónozták, és ezt *Escherichia Coli* törzsbe transzformálták. A baktérium-lizátumból laktóz-agaróz oszlopon izolálták a rekombináns fehérjét, amelynek tisztaságát SDS-polyacrilamide gélelektroforézissel és reverz-fázisú HPLC segítségével igazolták.

3.4.3. Citokin szintek meghatározása

A különböző kultúra felülúszókban és szérumban mintákban található citokinek mennyiségét minden esetben az R&D Systems, Inc. (Minneapolis, MN, USA) által gyártott, az adott citokinre specifikus Parameter™ ELISA Kit-ek segítségével, a cég utasításait követve határoztuk meg.

3.4.4. Polimeráz láncreakción alapuló módszerek

A 80-90%-ban konfluens MSC kultúrák sejtjeit, PBS-el történő mosást követően TRI REAGENT™ (Sigma-Aldrich) hozzáadásával lizáltuk. A mintákban található RNS-t az RT² qPCR-Grade RNA Isolation Kit (SA Biosciences, Frederick, MD, USA) segítségével, a gyártó utasításait követve izoláltuk. Az RNS-ek tisztaságát a Nano Drop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, USA) spektrofotométerrel ellenőriztük.

A *PCR Array* vizsgálatokhoz minden mintából 1.5 µg-nyi teljes RNS kivonatot írtunk át cDNS-re az RT² First Strand Kit (SA Biosciences) segítségével. Ezek a cDNS-ek szolgáltak aztán kiindulásul a SYBR® Green felhasználásán alapuló, RT² SYBR Green qPCR Master Mix-el (SA Biosciences) végzett, valós idejű (real-time) PCR reakciókhoz. A cDNS-ek amplifikációját Roche Light Cycler 480 készülékkel (F. Hoffmann-La Roche Ltd., Basel, Svájc) végeztük, úgy, hogy a 10 perces 95°C-on végzett aktiválást 40, 15 másodpercig tartó, 95°C-os denaturálási és 1 perces, 60°C-os amplifikációs ciklus váltotta

egymást. Az RT² Profiler PCR Array System, *Mouse Mesenchymal Stem Cell PCR Array* és *Mouse Homeobox Genes PCR Array* (SA Biosciences) segítségével, a gyártó utasításait követve, egyidejűleg 84-84 gén kifejeződését tudtuk meghatározni. A kontrollnak választott, 14 napos állatokból származó Cs-MSC-k és a többi MSC populáció génkifejeződési adatainak összehasonlító elemzése során a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk úgy, hogy az egyes gének C_t értékeit először mindig a *Hprt* háztartási génre normalizáltuk az SA Biosciences által felkínált weboldal - (<http://sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php>) – segítségével. A relative mRNS szintek átlagértékeit három független biológiai minta adatai alapján számítottuk ki. Az eredmények statisztikai analizését Kruskal-Wallis próbával, az SPSS 13.0 program felhasználásával végeztük. Az eredményt 0,05-nél kisebb P érték esetén tekintetük szignifikánsnak.

A különböző MSC populációk *Pou5f1*, *Nanog*, *Zfp42*, *Brachyury (T)*, *Klf4*, *Acta2*, *Gata4*, *Gata6* és *Nkx2.5* génjeinek kifejeződését kvantitatív Real-Time (valós idejű) PCR (qRT-PCR) módszerrel határoztuk meg. Ebben az esetben a transzkriptumok mennyiségét a *Gapdh* génről átíródott mRNS-ére normalizáltuk (TaqMan Gene Expression Assays, Applied Biosystems). Az egyes génekre specifikus primerek katalógusszámaait a 7. táblázatban mutatjuk.

7. táblázat. A kvantitatív Real-Time PCR (qRT_PCR) során alkalmazott primerek katalógusszámai

GAPDH	Applied Biosystems	Mm99999915-g1
Nanog	Applied Biosystems	Mm02384862-g1
Pou5f1 (Oct4)	Applied Biosystems	Mm00658129-gH
Zfp42 (Rex1)	Applied Biosystems	Mm01194090-g1
Brachyury (T)	Applied Biosystems	Mm01318252-m1
Klf4	Applied Biosystems	Mm00516105-g1
Acta2	Applied Biosystems	Mm01204962-gH
Gata4	Applied Biosystems	Mm00484689-m1
Gata6	Applied Biosystems	Mm00802636-m1
Nkx2.5	Applied Biosystems	Mm00657783-m1

A csontvelő transzplantáció után kialakuló kimerizmus vizsgálatához az egér csontvelői magvas sejtekből Puregene DNS izoláló Kit (Gentra Systems, Minneapolis, MN, USA) segítségével izoláltuk a nukleinsavat. A polimeráz láncreakciót a Byrne és mtsai (Byrne P et al. 2002) által leírt, az Y kromoszómán található *zfy* gén egy szakaszára specifikus primerekkel (sense: TGG AGA GCC ACA TAA CCA; antisense: TCC CAG CAT GAG AAA GAT TCT TC; Genodia Molekuláris Diagnosztikai Kft., Budapest) végeztük. A kapott PCR terméket elektroforézissel mutattuk ki, ehhez 1,5%-os agaróz gélt és etidium-bromidos (Sigma-Aldrich) festést alkalmaztunk.

3.4.5. Western blot

Az MSC-ket feltripszineztek, centrifugáltak, és a hideg PBS-sel mosott üledékhez (2×10^7 sejt) 1 ml, 25 mM HEPES-t, 1% Triton X-100-at, 5 mM KCl-ot, 0.5 mM $MgCl_2$ -ot, 1mM DTT-t, és 1 mM PMSF-et (phenylmethanesulfonylfluorid) tartalmazó lízis puffert adtunk. A citoplazmatikus fehérjéket és az intakt sejtmagokat 15 perces, 13 000 g-n végzett centrifugálással elválasztottuk egymástól, majd a nukleáris üledéket redukáló loading pufferben reszuszpendáltuk és felforrtattuk. A magi fehérjéket 7.5-12% SDS-PAGE gélen megfutattuk, átvittük nitrocellulóz membránra (GE Healthcare, Little Chalfont, Egyesült Királyság), és azonnal blokkoltuk TBS-Tween-ben oldott zsírmentes tejporral. Ezután a membránt kecskében termelt anti-TBX5-IgG-vel (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, USA), majd torna peroxidázzal jelölt számár anti-kecske IgG ellenanyaggal (Santa Cruz Biotechnology) kezeltük. A specifikus kötődést Amersham ECL Plus reagenssel (GE Healthcare), a gyártó utasításait követve mutattuk ki.

3.4.6. Szövettan, immunhisztokémia és immunfluoreszcencia

A hasnyálmirigyből, a májból és a tüdőből származó szövetmintákat 4%-os, semleges kémhatásúra puffereelt formalinban rögzítettük. Ezután paraffinba ágyztuk és 5 μ m vastagra metszettük őket. Végül a készítményeket haematoxylin-eozinnal festettük (HE, Sigma-Aldrich).

A formalinban fixált szövetekből készült metszeteken immunhisztokémiai vizsgálatokat is végeztünk. Ehhez először eltávolítottuk a paraffint és rehidratáltuk a szöveteket, majd hidrogén-peroxid oldatban végzett inkubációval gátoltuk az endogén peroxidáz enzimek aktivitását. Ezt követően monoklonális egér anti-inzulin IgG ellenanyagot cseppentettünk a metszetekre (1:1000-es hígításban). 15 perc elteltével biotinnal konjugált nyúl anti-egér IgG-t (1:200), majd peroxidáz enzimmal jelölt

streptavidint (1:500) adtunk (mind Sigma-Aldrich) a mintákhoz. Végül a diaminobenzidinnel (Peroxidase Kit; Dako, Glostrup, Dánia) kezelt metszeteket HE-nal is megfestettük. Kontrollként anti-inzulin ellenanyaggal nem kezelt készítményeket alkalmaztunk.

Az α -SMA, Mx, Pitx1, Tbx5, En2, és Hox11/Tlx1 fehérjék kimutatásához az MSC-eket 8 kamrás tárgylemezen (CultureSlides, BD Falcon) növesztettük, hideg PBS-el mostuk, 2%-os – PBS-ben oldott – paraformaldehidben fixáltuk, Triton X-100-al (Sigma-Aldrich) permeabilizáltuk, és 1%-os BSA-val (Sigma-Aldrich) blokkoltuk. Az α -SMA-t Cy3-mal (sárga-zöld ciánfesték) konjugáltatott monoklonális eger anti- α -SMA (Sigma-Aldrich) ellenanyag (1:100) segítségével mutattuk ki. A kecske anti-Mx, anti-Pitx1, anti-Tbx5, anti-En2 és nyúl anti-Hox11/Tlx1 (Santa Cruz Biotechnology) poliklonális IgG-kkel (1:50) 4°C-on inkubált mintákhoz második ellenanyagként NorthernLights™ 557-tel jelölt számar anti-kecske IgG-t (R&D Systems), illetve Alexa488-cal konjugáltatott kecske anti-nyúl IgG-t (Invitrogen) (1:200) adtunk. A mintákat Olympus BX51 epifluoreszcens mikroszkóp (Olympus Europa, Hamburg, Németország) alatt vizsgáltuk és Fview II digitális kamerával (Olympus) fotóztuk.

3.4.7. Fluoreszcens in situ hibridizáció

A transzplantációs kísérletek során kialakuló kimerizmus vizsgálatát, vagyis a nőstény recipiensek szöveteiben (csontvelő, pancreas, vér) megjelenő, a hímnemű donorokból származó sejtek kimutatását, Y kromoszóma specifikus fluoreszcens *in situ* hibridizációval (FISH) végeztük (Albera C et al, 2005). A formalinnal fixált, paraffinba ágyazott hasnyálmirigy metszeteket viasztalanítottuk, rehidráltuk, majd 1 órán át blokkoltuk Tris-pufferben (TBS) oldott zsírszegény tejporral. A FITC-cel jelölt Y-kromoszóma specifikus próbát (StarFish 1189-YMF-01, Cambio, Cambridge, UK) a gyártó ajánlása szerint alkalmaztunk. A metszeteket desztillált vízben mostuk, 10 percig inkubáltuk 80°C-on Na-tiocianátban, majd 0.1 M-os sósavban oldott 0.4% pepszinnel (Sigma-Aldrich) 10 percig emésztettük őket. Ezután 4%-os paraformaldehidben fixáltuk a mintákat, felszálló alkoholsorban dehidratáltuk, és végül levegőn szárítottuk. Az így előkészített metszetekre cseppentettük a StarFish Y próbát, lefedtük őket, gumicementtel lezártuk, és 10 percig 60°C-on denaturáltuk a készítményeket. Egy éjszakás 37°C-on történt inkubálás után a fedőlemezeket eltávolítottuk, a metszeteket átöblítettük formamiddal, 2-szeres, majd 1-szeres töménységű SSC-vel (standard saline citrát), és végül PBS-el. Diamidino-2-phenylindollal (DAPI) történt festés után a metszeteket

Vectashield oldatban újra lefedtük (Vector Lab. Burlingame, CA, USA). A reakció specificitását egészséges kontroll hím és nőstény egerek hasnyálmirigyéből készült metszeteken ellenőriztük. Végül a preparátumokat egy Fview II digitális fényképezőgéppel ellátott, Olympus BX51 epifluoreszcencia mikroszkópban (Olympus Europa, Hamburg, Németország) értékeltük. A képeket 40-szeres nagyítással, 0,75 NA lencsékkel készítettük és az AnalySIS Pro programmal dolgoztuk fel. Kettős jelölésnél a TBS-es mosás után – de még a FISH előtt - egér monoklonális anti-inzulin IgG-t, majd egy óra inkubálás és TBS-es mosás után, alkalikus foszfatáz enzimmal konjugáltatott nyúl anti-egér IgG antitestet (mindkettő Sigma-Aldrich) cseppentettünk a metszetekre. Az enzim aktivitását Fast Red (Sigma-Aldrich) festék hozzáadásával mutattuk ki.

A csontvelői és a vérsejtek FISH analízisét a szokásos citogenetikai módszerekkel végeztük, beleértve a hipotóniás KCl oldattal 37C⁰-on, 20 percig tartó inkubációt és a fixációs lépéseket (ecetsav/metanol 1:3). Ebben az esetben egy rodaminnal jelölt Y kromoszóma specifikus DNS próbát (QBIOgene, Irvine, CA, USA), vagy a már fent említett StarFish 1189-YMF-01 próbát alkalmaztunk a gyártó útmutatásait követve. A hibridizációt követően a mosási lépéseket a formamidos eljárással végeztük. Mintánként legalább 50 magot számoltunk meg.

3.5. A diabetes modell

3.5.1. A betegség indukciója és követése

Fiatal felnőtt (8-10 hetes) nőstény C57Bl/6 egerek 5 egymást követő napon 50-50 mg/testsúly kg streptozotocint (STZ, Sigma-Aldrich) kaptak intraperitoneálisan (ip). Az STZ-t minden oltás előtt frissen oldottuk nátrium-citrát (pH=4,5) pufferben. Az állatok testsúlyát laboratóriumi mérlegen, vércukorszintjüket glükométerrel (Accu-Chek Active vércukorszintmérő, F. Hoffmann-La Roche, Basel, Svájc) hetente két alkalommal mértük.

A szérum inzulinszinteket patkány és egér inzulinra specifikus ELISA Kit (Linco Research, St. Charles, MO, USA) segítségével határoztuk meg. Azokat az állatokat tekintettük cukorbetegnek, amelyek éhezés utáni vércukorszintje az STZ kezelés megkezdését követő 14. és a 15. napon meghaladta a 10 mmol/l-t. (Az egészséges kontroll C56Bl/6 egerek vércukorszintje 4-5 mmol/l volt). Az állatkísérletek az Országos Gyógyintézeti Központ Munkahelyi Állatkísérleti Bizottsága által előírt szabályoknak megfelelően folytak.

3.5.2. Glükóz tolerancia teszt

Négy órás éhezést követően 2 g/testsúly kg glükózt adtunk az állatoknak ip. A cukor feldolgozását a vércukorszint 30 percenkénti mérésével követtük nyomon.

3.5.3. A cukorbeteg egerek transzplantációja

A beavatkozást a 3.3.1.-ben leírtak szerint végeztük, annyi módosítással, hogy a csontvelőhalált okozó (900 cGy) besugárzás mellett egyes kísérleti csoportokban csak szubletális (450, 250, vagy 150 cGy) előkészítő kezelést alkalmaztunk. A frissen szeparált szingén csontvelői magvas sejteket és az *in vitro* kultúrában felszaporított, szingén (C57Bl/6), szemiallogén ((C57Bl/6xDBA/2)F1), vagy allogén (CD1, illetve EGFP-Tg CD1) MSC-eket az STZ kezelés megkezdése utáni 15. napon intravénásan adtuk a cukorbeteg és az STZ-vel nem kezelt, kontroll állatoknak.

3.6. Statisztikai analízis

Eredményeink statisztikai analízisét – ahol ez lehetséges volt - Student-féle *t*-próbával végeztük, az eredményeket 0,05-nél kisebb *P* érték esetén tekintetük szignifikánsnak. A túlélési görbéket a Kaplan-Meier-féle analízis segítségével jelenítettük meg. Két túlélési görbe összehasonlítása során a szignifikanciát a Mann-Whitney-féle *U* próba segítségével határoztuk meg. A PCR array-k statisztikai analízisét Kruskal-Wallis próbával végeztük (ld. még 3.4.4.-ben).

4. Eredmények

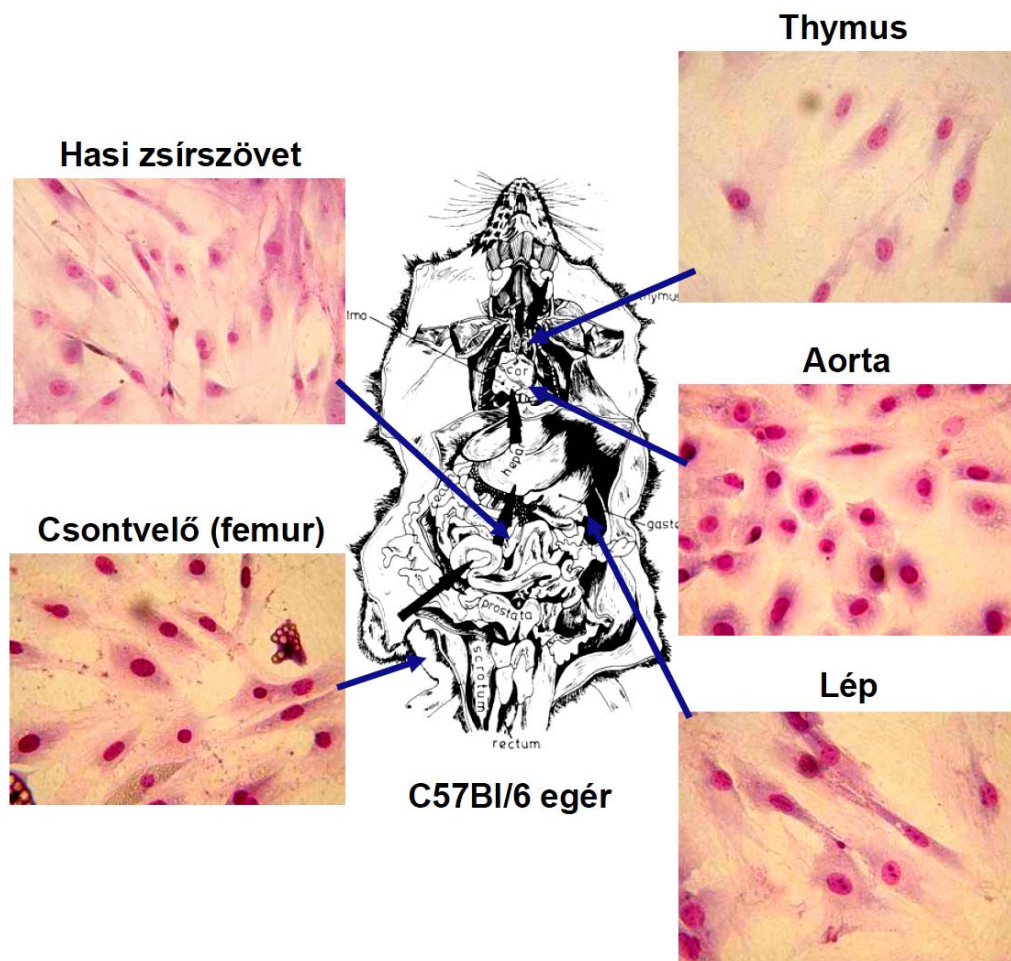
4.1. Különböző eredetű adherens stroma sejtek izolálása és jellemzése

4.1.1. Az egér csontvelőből, zsírszövetből, lépéből, aorta falból és thymusból származó stroma sejtek felszíni markerei és differenciálódási képessége

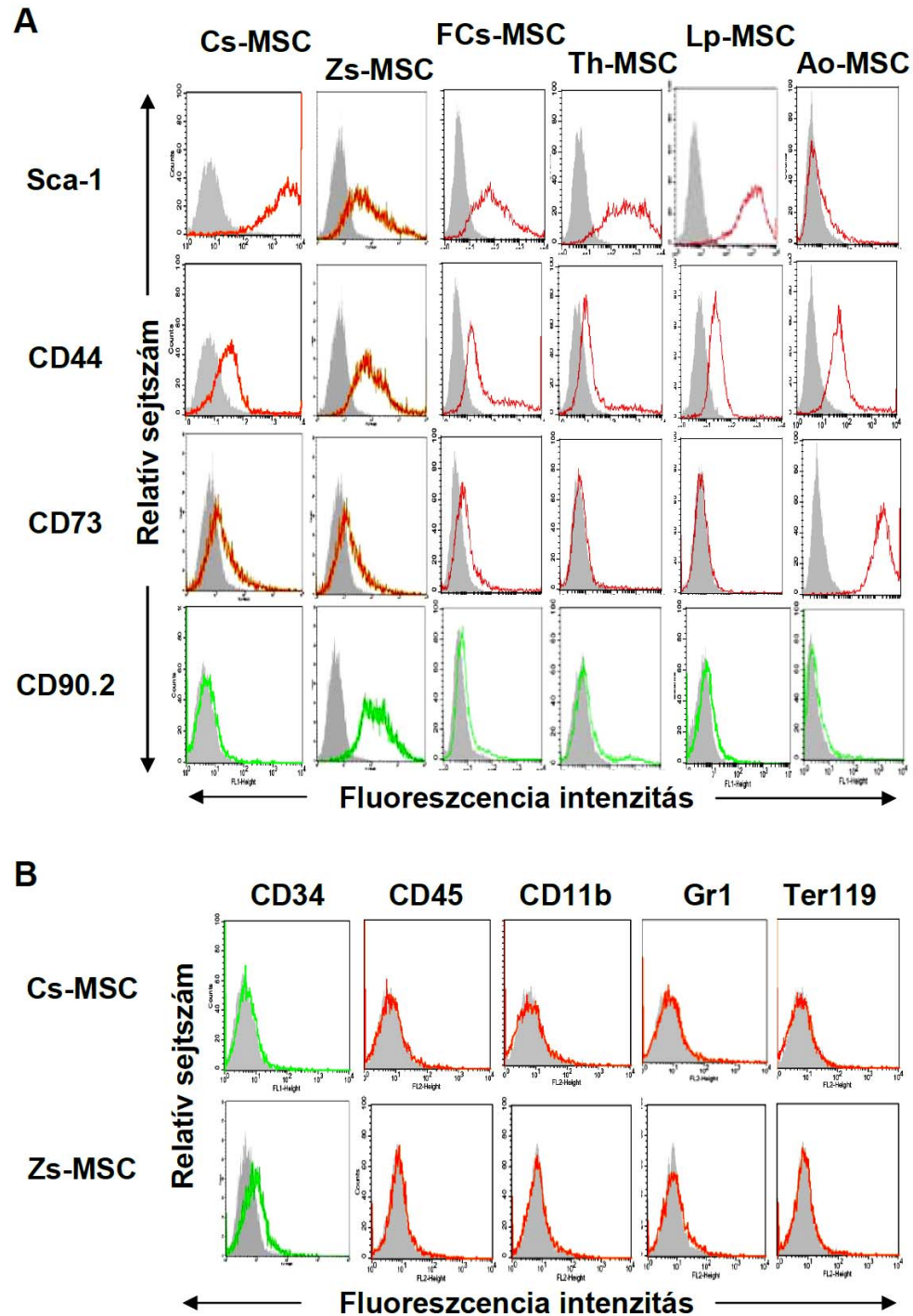
Fiatal (14 napos) és felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6-os egerek különböző szerveiből és szöveteiből stroma tenyészeteket készítettünk a 3.2.1. fejezetben leírtak szerint. Kísérleteinket minden esetben 8-15-ször átoltott sejtekkel végeztük, mivel korábbi tapasztalataink és irodalmi adatok szerint is (Peister A et al, 2004) - a csontvelői (és részben a zsírszövet eredetű) stroma tenyészetek a 7-8. átoltásig vérképző elemeket – elsősorban macrophagokat - is tartalmaznak. A 8. átoltás után minden tenyészetünk homogén, adherens, fibroblast-szerű morfológiát mutató sejtekből áll (12 ábra), amelyek Sca-1 és CD44 pozitívak, CD73-at azonban változó mennyiségben fejeznek ki. Csak az aorta falából izolált (Ao-MSc) sejtek fluoreszkálnak intenzíven PE-nel konjugáltatott anti-CD73 ellenanyag jelenlétében, míg a fiatal állatok lépéből (Lp-MSc) és thymusából (Th-MSc) származó sejtek CD73 negatívak. CD90.2 antigént pedig kizárólag a zsírszövet eredetű (Zs-MSc) stroma sejtek – igaz ezek nagy mennyiségben – expresszálnak (13A ábra). Ugyanakkor egyik tenyészet sem tartalmaz hematopoetikus (CD34, CD45, CD11b, Gr-1, Ter-119) vagy endothel (CD31) markereket (13B ábra, ill. nem mutatjuk) hordozó sejteket és lágy gélben nem képeznek hematopoetikus (BFU-E és CFU-GM) kolóniá(ka)t (nem mutatjuk).

Mind a hat vizsgált mintában kifejeződnek az osteogén és adipogén differenciálódás során nélkülözhetetlen „mester” transzkripciós faktorok génjei (*Runx2*, *Bglap1*, ill. *Pparg*), igaz a *Bglap1* (osteokalcin) expressziója a kontroll – 14 napos csontvelői eredetű (FCs-MSc) sejtekéhez képest – az összes többi mintában szignifikánsan csökken (14A ábra). Ezzel összhangban, megfelelő induktorok jelenlétében, az összes sejttenyészetben megfigyelhető a sejtek osteoblast, illetve adipocita irányú differenciálódása (14B ábra). Vagyis a csontvelőn és a zsírszöveten kívül a thymusban, a lépben és az aorta falában is található mesenchymalis ős- vagy stroma sejtek. Ez összhangban van azokkal a korábbi irodalmi adatokkal, amelyek szerint MSC-k valójában minden szervünkben előfordulnak (da Silva Meirelles L et al, 2006).

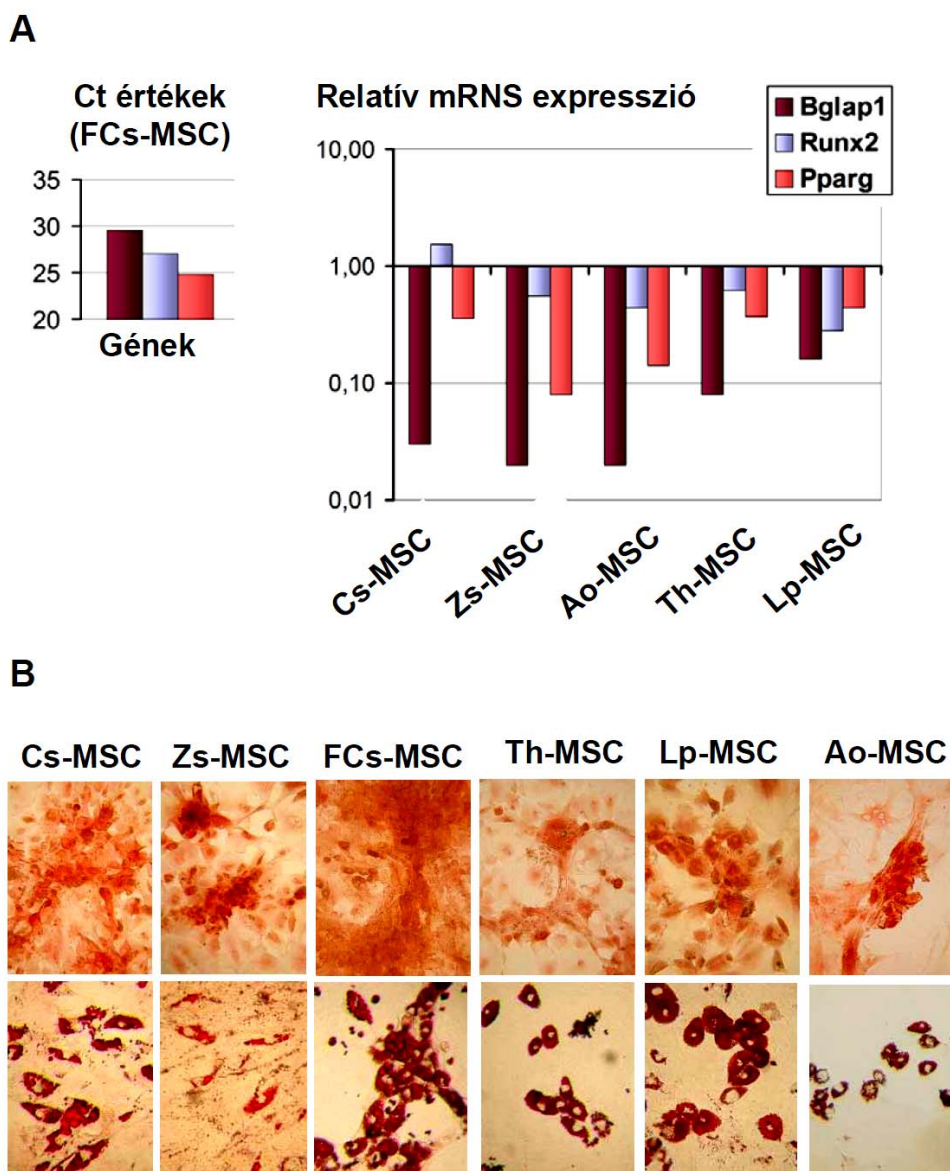
Itt kell megjegyezni, hogy a 7-8-szor átoltott egér MSC-k a tenyésztés során kivétel nélkül spontán immortalizálódnak, tehát a továbbiakban már korlátlan ideig fenntarthatók *in vitro* kultúrában. Fenotípusukat és plaszticitásukat azonban legalább a 20-25. átoltásig megőrzik, nem veszítik el kontakt-gátlásukat, és nem képeznek tumort *in vivo* ($>2 \times 10^6$ sejt/állat).



12. ábra. A sejtenyésztésben növekedő - különböző egér szervekből/szövetekből izolált - adherens stroma sejtek morfológiája. Reprezentatív képek (Giemsa festés; az eredeti nagyítás 10x-es).



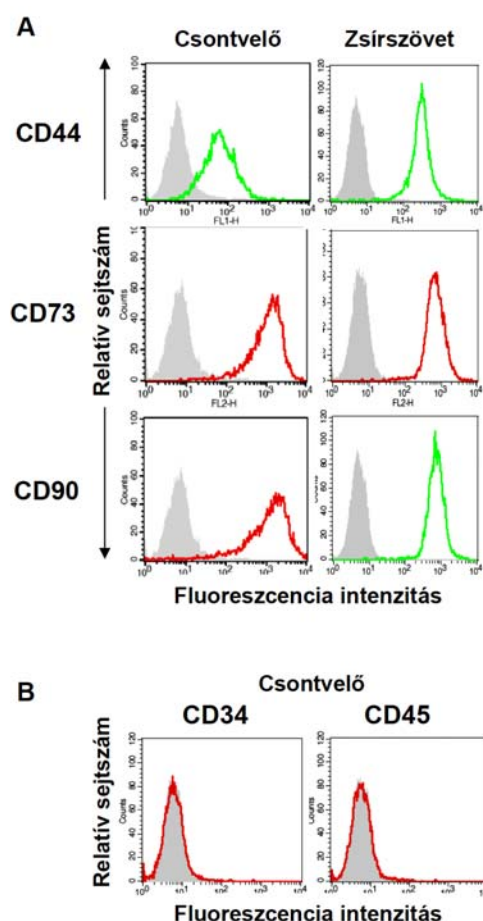
13. ábra. A különböző anatómiai eredetű egér MSC populációkat alkotó sejtek jellemzése felszíni markereik alapján. A sejtek fenotípusát áramlási citometria segítségével határoztuk meg. A szürke hisztogramok a kontroll, a színes görbék a specifikus ellenanyaggal jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitását jelzik. (A) feltételezett „MSC markerek”, (B) hematopoetikus markerek. Ötből egy reprezentatív kísérlet eredménye.



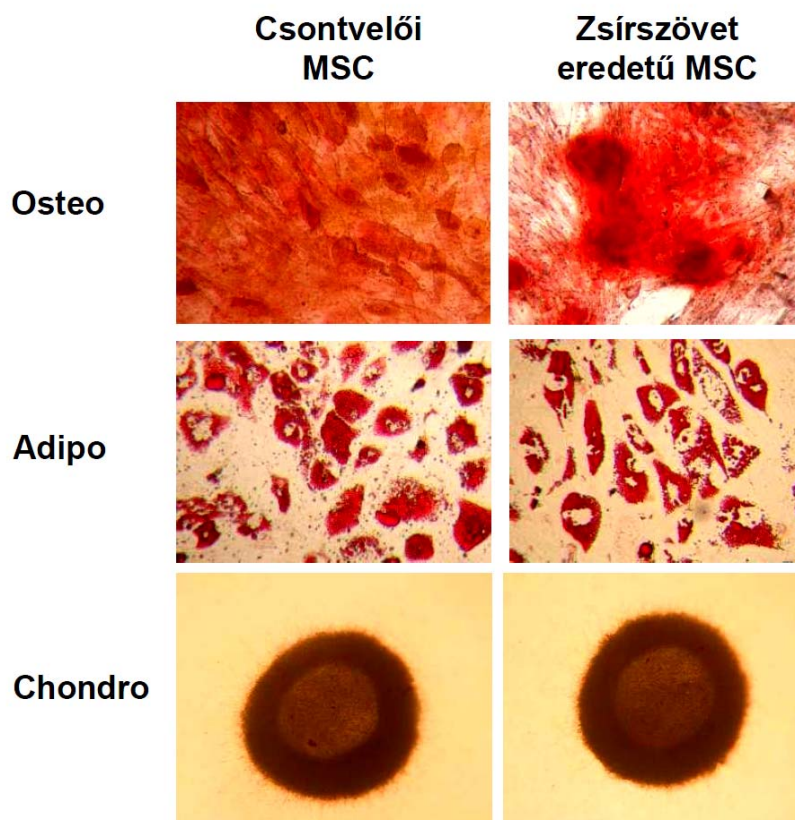
14. ábra. Az egér MSC-k plaszticitása. (A) Az osteogenezisben (*Bglap1*, *Runx2*) és az adipogenezisben (*Pparg*) kulcsszerepet játszó gének kifejeződése a különböző MSC populációkban. A kontrollnak választott, 14 napos állatokból származó FCs-MSCs-k és a többi MSC populáció génkifejeződési adatainak összehasonlító elemzése során a $\Delta\Delta C_t$ módszert alkalmaztuk úgy, hogy az egyes gének C_t értékeit először mindig a *Hprt* háztartási génre normalizáltuk. A bal oldali, kisebb diagram mutatja a három gén kifejeződését (a jellemző C_t értékeket) az FCs-MSCs-kben, a jobb oldali, nagyobb keretben pedig ugyanezen mRNS-eknek a többi sejtpopulációban kimutatható – a kontroll FCs-MSCs-kben mértékhez viszonyított - relatív mennyiségét ábrázoltuk. A relatív mRNS szintek átlagértékeit mindig három független biológiai minta adatai alapján számítottuk ki. Az eredmények statisztikai analizését Kruskal-Wallis próbával végeztük. Szignifikánsnak a 0,05-nél kisebb P értékeket tekintettük. (B) A sejtek osteoblast és adipocita irányú differenciálódása *in vitro* kultúrában. Az extracelluláris mátrixban lerakódott kalciumot alizarinvörös, a zsírsejtekben felhalmozódott lipidcseppeket olajvörös festéssel mutattuk ki. Reprezentatív képek (az eredeti nagyítás 10, illetve 20x-os).

4.1.2. Az emberi csontvelőből és zsírszövetből izolált stroma sejtek összehasonlító vizsgálata

Az emberi csontvelő mononukleáris sejtfrakciójából és a zsírszövet SVF frakciójából indított adherens sejtenyészetek már 2-3 áttöltés után homogének és vérképző elemektől mentesek. Kizárólag CD44, CD73 és CD90 pozitív, de CD34 és CD45 negatív sejtekből állnak (15. ábra), amelyek a megfelelő induktorok jelenlétében osteoblast, adipocita és chondrocyta irányba egyaránt képesek differenciálódni (16. ábra). Az emberi MSC-k, az egér őssejtektől eltérően nem immortalizálódnak a tenyésztés során. A csontvelői MSC-k általában 6-12, a zsírszövet eredetű sejtek 8-16 áttöltés után szeneszcenssé válnak, osztódásuk megáll. Öregedésük sebessége azonban nagyban függ a donor korától és egészségi állapotától.



15. ábra. **Emberi csontvelőből és zsírszövetből származó MSC-k jellemzése felszíni markereik alapján.** A sejtek fenotípusát áramlási citometria segítségével határoztuk meg. A szürke hisztogramok a kontroll, a színes görbék a specifikus ellenanyaggal jelölt sejtek fluoreszcencia intenzitását jelzik. (A) „MSC markerek”, (B) hematopoetikus markerek. Ötből egy reprezentatív kísérlet eredménye.



16. ábra. **Emberi MSC-k osteoblast, adipocita és chondrocyta irányú differenciál-tatása *in vitro* kultúrában.** Az extracelluláris mátrixban lerakódott kalciumot alizarinvörös, a zsírsejtekben felhalmozódott lipidcseppeket olajvörös festéssel mutattuk ki. A porckezdeményeket natív formájukban fotóztuk. Reprezentatív képek (az eredeti nagyítás 10, 20, illetve 4x-es).

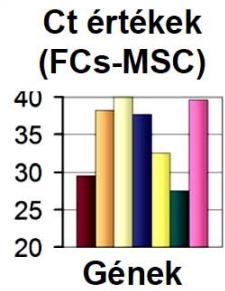
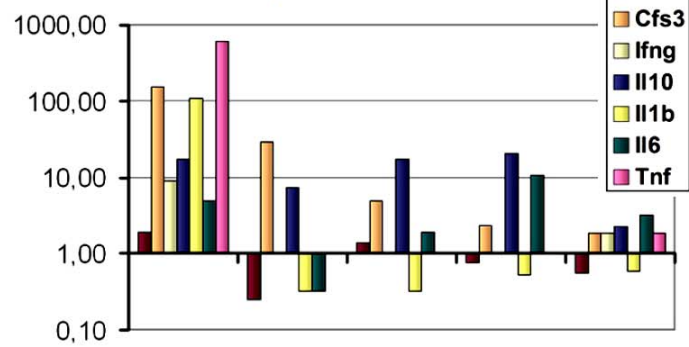
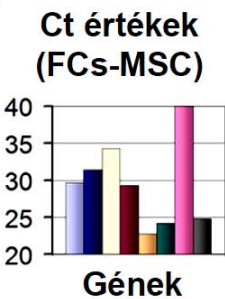
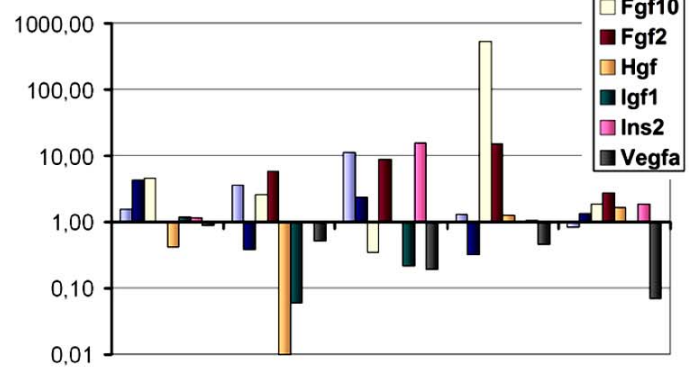
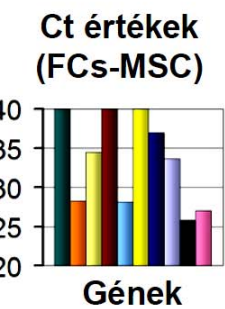
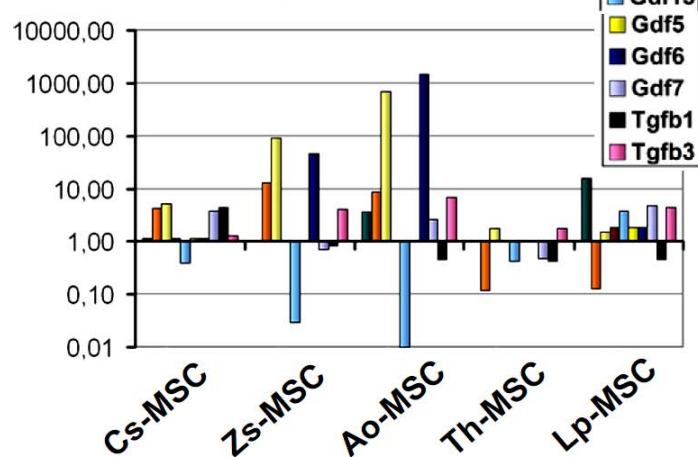
4.2. Az egér mesenchymalis őssejtpopulációk közös „genetikai ujjlenyomata”

A hat különböző egér MSC populáció sejtjeiben összesen 176 gén kifejeződését vizsgáltuk kvantitatív RT-PCR módszerrel. Két, kereskedelmi forgalomban kapható array (*Mouse Mesenchymal Stem Cell* és *Mouse Homeobox (HOX) Genes PCR array*) segítségével 84-84 génről, egyedileg tervezett primerek felhasználásával pedig további 8 génről átíródott mRNS-ek relatív koncentrációját határoztuk meg mintáinkban $\Delta\Delta Ct$ módszerrel úgy, hogy a viszonyítási alap minden esetben a 14 napos egerek csontvelői MSC-iben mért ΔCt érték volt. 16 gén expresszióját – áramlási cytometriás, ELISA, Western blot, és/vagy immunfluoreszcens – módszerrel fehérje szinten is igazoltuk.

Megállapítottuk, hogy IL-6-ot és GM-CSF-et (*Csf2*) kódoló mRNS-ek az összes MSC populációban kimutathatók (17A ábra), és ezeknek a citokineknek a jelenléte a sejtek felülúszóiban is igazolható ELISA módszerrel (nem mutatjuk). A *Csf3*- és *Il10*-specifikus transzkriptumok szintje viszont - az FCs-MSC-kben mértekhez képest - szignifikánsan ($P=0,034$, ill. $P=0,026$) magasabb a többi mintában. A Cs-MSC-k pedig – a többi MSC populációhoz képest – kiemelkedően sok *Csf3*, *Il1b* ($P=0,007$), *Ifng* ($P=0,013$), és *Tnfa* ($P=0,007$) specifikus mRNS-t tartalmaznak (17A ábra), ezek a citokinek azonban – fehérje szinten - nem mutathatók ki a sejtek felülúszóiban (nem mutatjuk).

A különböző növekedési faktorokat kódoló gének kifejeződésében szintén vannak különbségek az eltérő eredetű MSC populációk között (17B ábra). A fiatal állatok Cs-MSC-i a hepatocytá növekedési faktort (*Hgf*), az inzulin-szerű növekedési faktor 1-et (*Igf1*), a vaszkuláris endothelialis növekedési faktor A-t (*Vegfa*), az agyi-eredetű neutrofikus faktort (*Bdnf*), a fibroblast növekedési faktor 2-t és 10-et (*Fgf2*, *Fgf10*), és az epidermalis növekedési faktort (*Egf*) kódoló géneket expresszálják. Ehhez képest a Zs-MSC-kben a *Hgf* és *Igf1*, az Ao- és Lp-MSC-kben pedig az *Igf1* és a *Vegfa* gének kifejeződése csökkent szignifikánsan ($P=0,017$, ill. $P=0,013$). A csont morfogenetikus fehérje (BMP) családba tartozó mediátorokat kódoló gének közül a *Bmp4*, *Tgfb1*, és *Tgfb3* fejeződik ki hasonló mértékben az összes vizsgált MSC populációban (17C ábra). Ugyanakkor a *Gdf15* gén expressziója alacsonyabb ($P=0,017$), míg a *Gdf6* (BMP-13) és *Bmp6* géneké magasabb ($P=0,036$, ill. $P=0,033$) az Ao- és a Zs-MSC-kben, mint a többi mintában. A *Bmp13* gén fokozott expressziója az Ao- és a Zs-MSC-kben valószínűleg nem véletlen, hiszen a BMP-13 fehérje az osteogén differenciálódás egyik leghatékonyabb természetes gátlószere (Shen B et al, 2009).

17. ábra. Citokineket, növekedési és differenciálódási faktorokat kódoló gének kifejeződése a különböző egér MSC populációkban. Az adatok feldolgozása és ábrázolási módja megegyezik 14.A ábránál leírtakkal. (A) citokinek (*Csf2*, *Csf3*, *Ifng*, *Il10*, *Il1b*, *Il6*, *Tnf*); (B) növekedési faktorok (*Bdnf*, *Egf*, *Fgf10*, *Fgf2*, *Hgf*, *Igf1*, *Ins2*, *Vegfa*); és a (C) BMP morfogén család tagjai (*Bmp2*, *Bmp4*, *Bmp6*, *Bmp7*, *Gdf15*, *Gdf5*, *Gdf6*, *Gdf7*, *Tgfb1*, *Tgfb3*).

A**Relatív mRNS expresszió****B****Relatív mRNS expresszió****C****Relatív mRNS expresszió**

A sejtadhéziós molekulákat kódoló gének közül a *cd44* (CD44), *Ctnnb1* (β -catenin), *Colla1* (1-es típusú kollagén α -lánc), és *Eng* (endoglin, CD105) hasonló mértékben fejeződik ki az összes MSC populációban. Az *Alcam* (aktivált leukocita adhéziós molekula, CD166) gén expressziója különösen a Cs-, Ao-, Zs-, és Lp-MSC-kben magas az FCs-MSC-khez képest ($P=0,010$). Az *Icam1* génről (intracelluláris adhéziós molekula 1, CD54) átíródott mRNS nem mutatható ki az FCs-MSC-kben és a Th-MSC-kben, de növekvő mennyiségben jelen van a következő mintákban: Lp-MSC < Cs-MSC < Ao-MSC < Zs-MSC. Némileg változó az *Mcam* (melanoma sejt adhéziós molekula, CD146) és a *Vcam1* (vaszkuláris sejt adhéziós molekula 1, CD106) gének expressziója is, előbbi főként a Zs- és Lp-MSC-kben ($P=0,043$), míg az utóbbi különösen az Lp-MSC-kben magas ($P=0,037$) a többi MSC populációhoz képest (18A ábra). A különböző integrin láncokat kódoló gének közül kettő, az *Itgax* (CD11c, integrin αx lánc) és az *Itgav* (CD51, integrin αv lánc) gyakorlatilag azonos mértékben fejeződik ki az összes mintában, míg az *Itgb1* (CD29, integrin $\beta 1$ lánc) expressziója a Cs-, Zs-, és Lp-MSC-kben, az *Itva6* (CD49f, integrin $\alpha 6$ lánc) kifejeződése pedig a Zs- és Ao-MSC-ben reprodukálható, de nem szignifikáns mértékben magasabb, mint a többi mintában (18B ábra).

Összességében tehát megállapítható, hogy a különböző szervekből/szövetekből izolált MSC-k eltérő mértékben ugyan, de jórészt azonos bioaktív faktorokat (citokineket, növekedési faktorokat, morfogéneket), adhéziós molekulákat és integrineket kódoló géneket fejeznek ki. További hasonlóság a különböző MSC populációk között, hogy egyikben sem expresszálódnak a pluripotens őssejtekre jellemző gének (*Pou5f1/Oct4*, *Nanog*, vagy *Rex1/Zfp-42*), kivéve a *Klf4*-et (19A ábra). A *Klf4* transzkripció faktorának azonban – azon kívül, hogy szerepet játszik a pluripotencia fenntartásában – számos egyéb funkciója is van (Evans PM and Liu C, 2008). A korai mesoderma marker *T* gén (*Brachyury*) mRNS-e is legfeljebb csak nyomokban fordul elő az MSC-kben (19B ábra). Ugyanakkor a *Colla1*, a *Vim*, és az *Acta2*, a kollagén 1 molekula α -láncát, a vimentint, illetve az α -simaizom aktint kódoló – a mesenchymalis sejtekre jellemző - gének az összes mintában kifejeződnek (20A ábra). Igaz, az *Acta2* mRNS mennyisége változó, a Zs- és Lp-MSC-kben egy nagyságrenddel magasabb ($P=0,024$), az Ao-MSC-kben viszont kissé alacsonyabb, mint az FCs-MSC-kben. Immunfluoreszcens vizsgálatok szerint az α -SMA fehérje viszonylag kis mennyiségben minden Ao-MSC-ben jelen van, míg a többi MSC populáció sejtjeinek csak 40-60%-a jelölődik anti- α -SMA ellenanyaggal. Utóbbiaknál

azonban az egyes sejtek jelölődése sokkal intenzívebb, mint az Ao-MSK-k esetében (20C ábra).

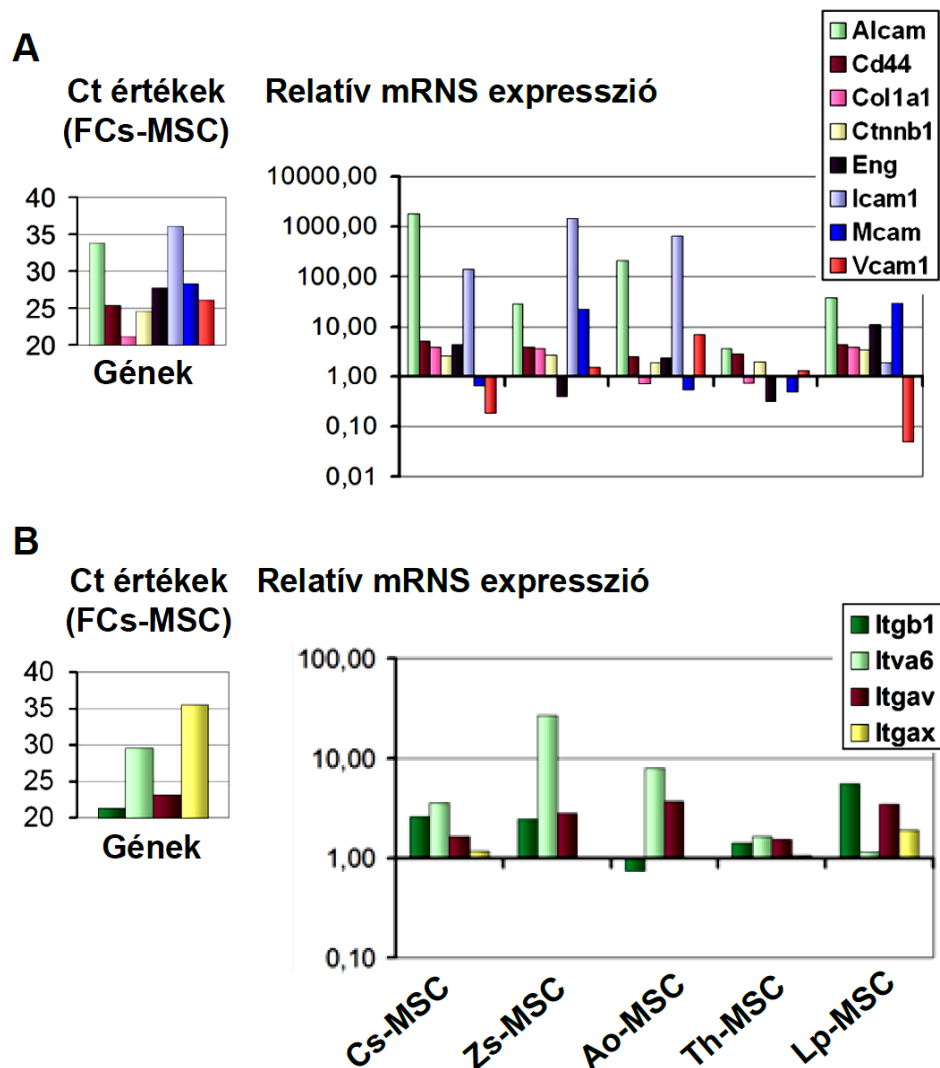
Három olyan transzkripciós faktort kódoló gén kifejeződését is vizsgáltuk, amelyek részt vesznek a mesoderma specifikációjának és differenciálódásának szabályozásában. Közülük a *Gata6* az összes mintában erőteljesen expresszálódik. *Gata4* és *Nkx2.5* specifikus mRNS viszont csak minimális mennyiségben van jelen a két csontvelői eredetű MSC populációban. Jóval magasabb (800-10000-szeres) *Gata4* expresszió mérhető a Zs-, Th-, Lp-, és Ao-MSK populációkban ($P=0,011$), míg az *Nkx2.5* kifejeződése a zsírszövet és lép eredetű MSC-kben emelkedett jelentősen a többi mintához képest ($P=0,049$) (20B ábra). Az általunk vizsgált, különböző szervekből és szövetekből származó adherens sejtpopulációk tehát feltehetően olyan mesodermális eredetű, mesenchymális markereket hordozó sejtekből állnak, amelyek genetikai ujjlenyomata jelentősen átfed.

4.3. A különböző eredetű mesenchymális őssejtek regionális identitása és eredete

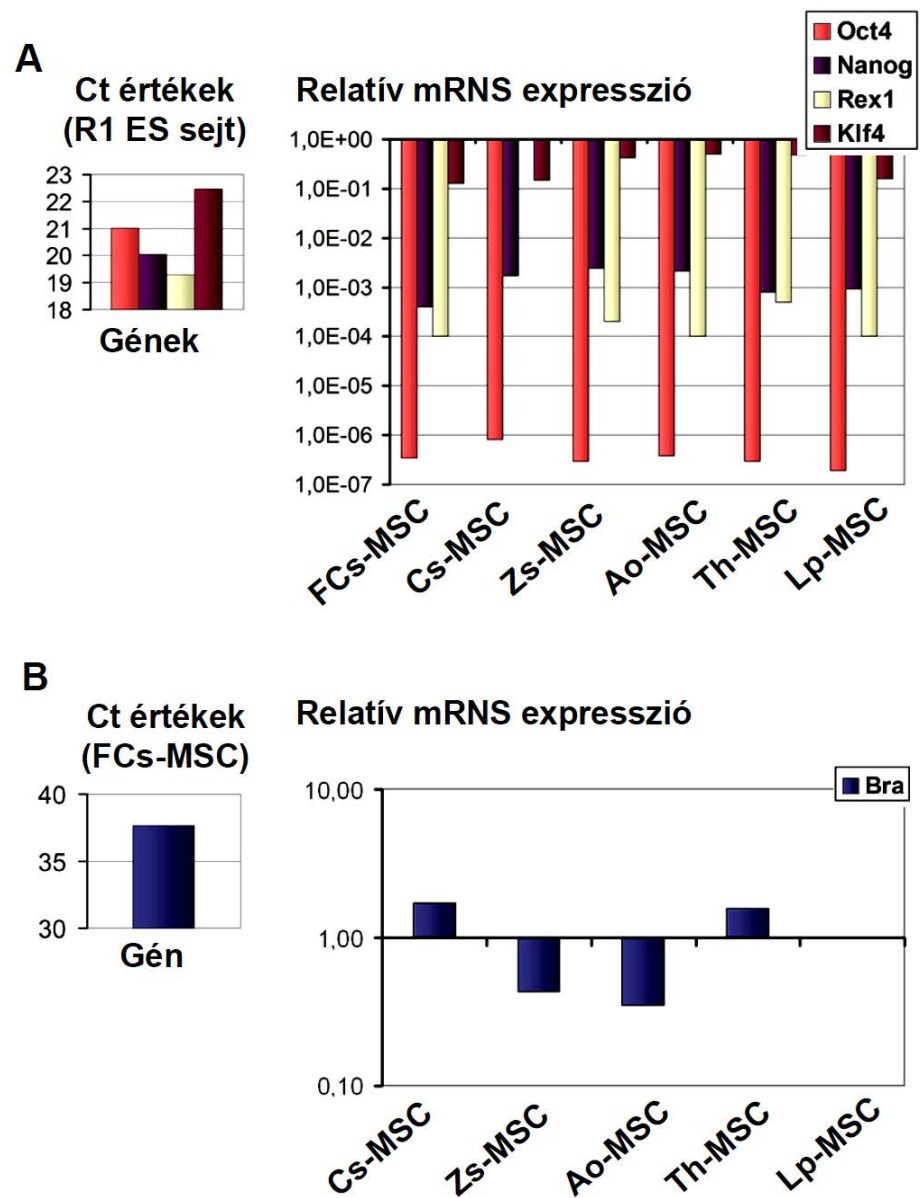
Mivel nem ismerünk olyan gént, amely csak az MSC-kben, illetve a belőlük származó különböző stroma sejtekben fejeződné ki, ezen őssejtek eredete és fejlődése a hagyományos „lineage tracing” módszerekkel közvetlenül nem, csak közvetett úton vizsgálható.

4.3.1. A *Hox*-kód

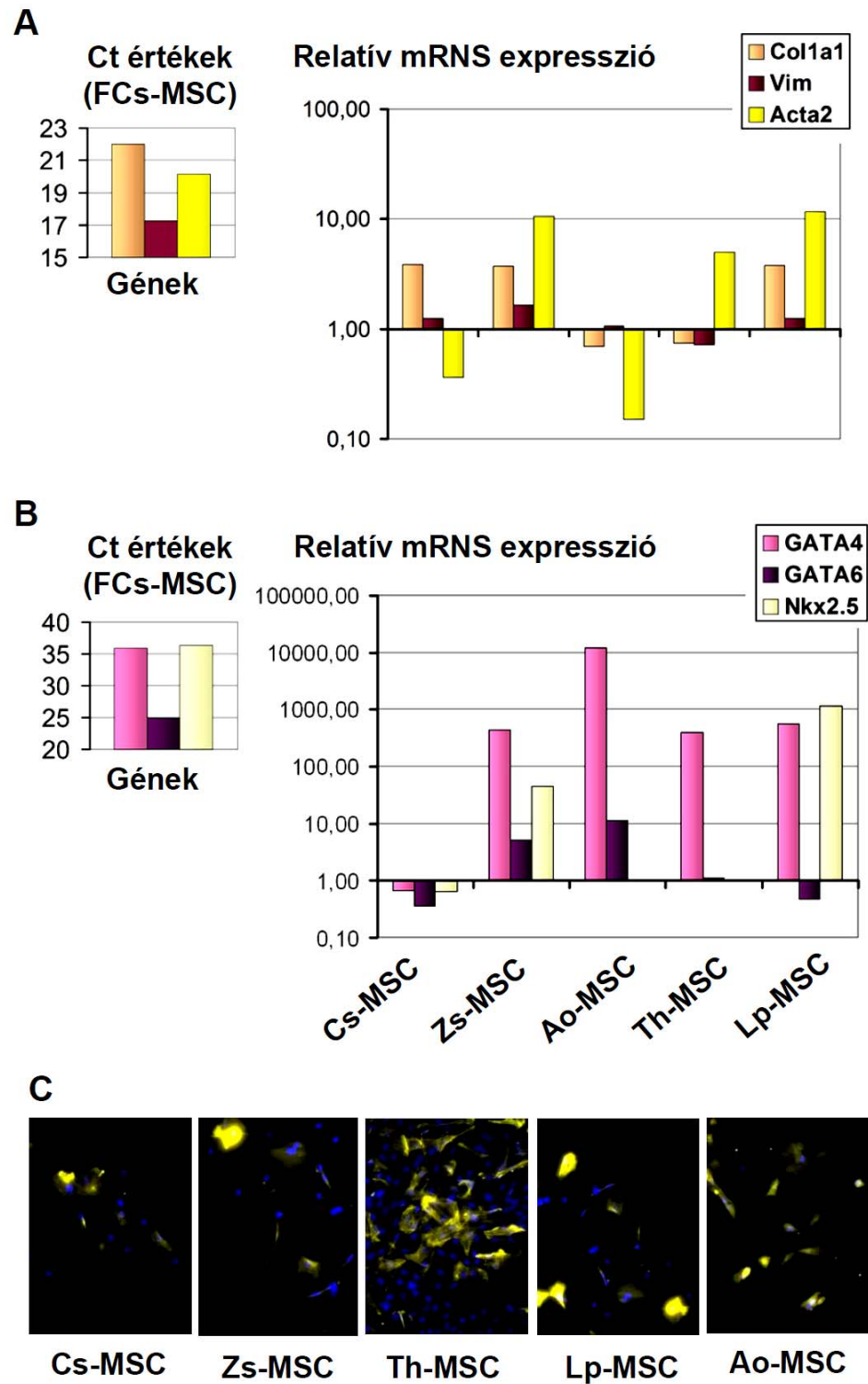
A homeotikus szelektor komplex génjei olyan, evolúciósan konzerválódott transzkripciós faktorokat kódolnak, amelyek az egyedfejlődés során biztosítják az élőlény hosszanti (antero-posterior) tengelyének (majd később a másodlagos tengelyeknek) a kialakulását, pozicionális információt biztosítva az egyes embrionális testszegmensek létrejöttéhez. A későbbiekben a testi sejtek *Hox*-gén expressziós mintázata az egyed egész élete során egyfajta „pozicionális memóriát” biztosít a sejteknek (Wang KC et al, 2009). Következő kérdésünk tehát az volt, vajon a különböző MSC populációk *Hox*-gén expressziós mintázata azonos, vagy markánsan különböző-e. Az egér *Homeobox (HOX) Genes PCR Array* segítségével kimutatható 24 *Hox*-gén közül ötnek (*Hoxa1*, 7, *Hoxb3*, 4, és *Hoxd9*) a kifejeződése az összes mintában egyértelmű, míg másik hatnak (*Hoxb1*, 9, és *Hoxd1*, 3, 12, 13) az mRNS-e egyáltalán nem detektálható (21A-D ábra). További 13 *Hox*-gén (*Hoxa9*, *Hoxb2*, 7, 8, *Hoxc6*, 8, 9, 10, 11, 12, 13, és *Hoxd4*, 8) kifejeződése azonban egyedi mintázatot mutat, ami arra utal, hogy a különböző anatómiai területekről származó MSC-k eltérő „*Hox*-gén expressziós ujjlenyomattal” rendelkeznek.



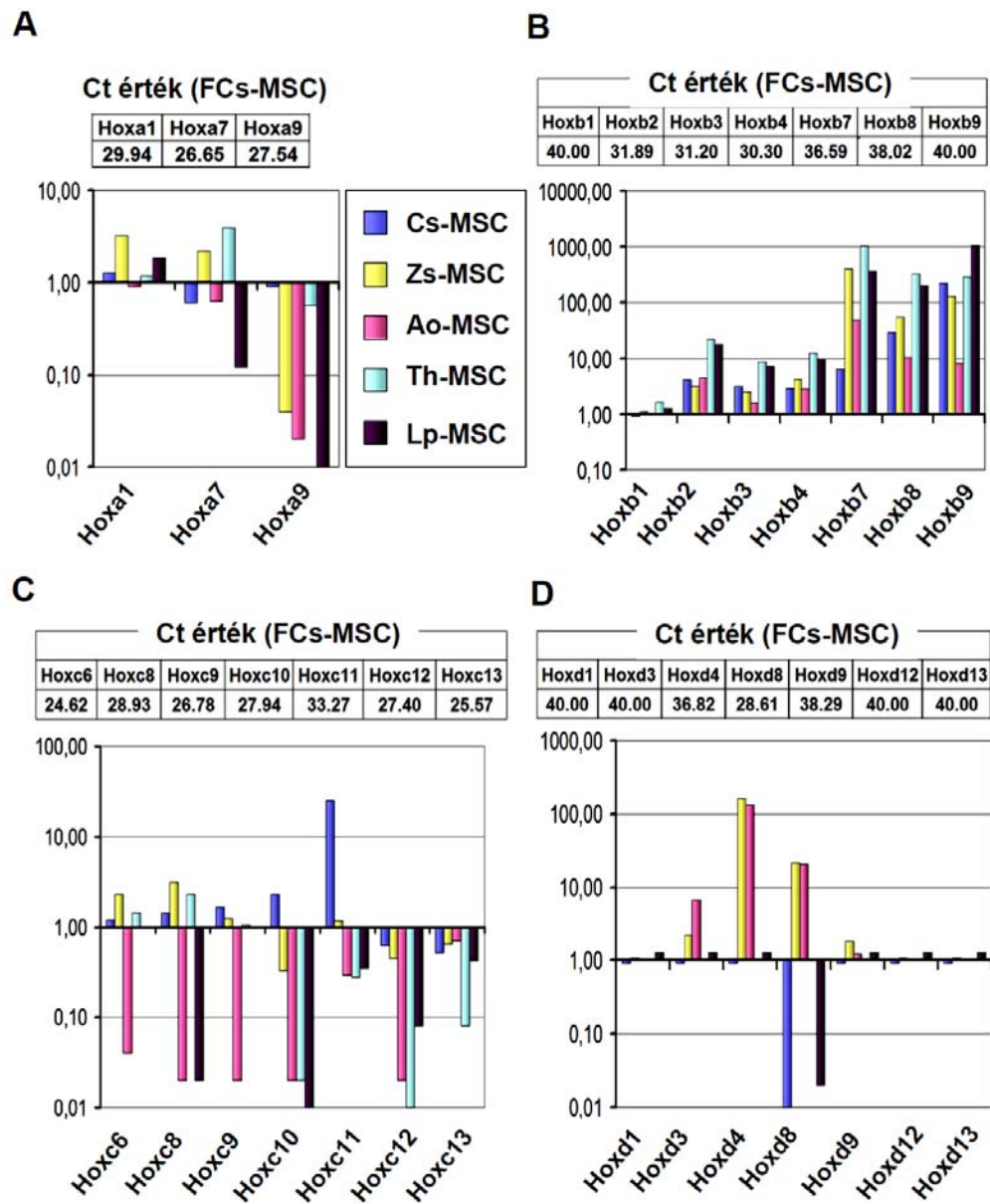
18. ábra. Sejt-sejt és sejt-extracelluláris mátrix kölcsönhatásokban résztvevő molekulákat kódoló gének kifejeződése a különböző egér MSC populációkban. Az adatok feldolgozása és ábrázolási módja megegyezik 14.A ábránál leírtakkal. (A) adhéziós molekulák (*Alcam*, *Cd44*, *Col1a1*, *Ctnnb1*, *Eng*, *Icam1*, *Mcam*, *Vcam1*); (B) integrinek (*Itgb1*, *Itva6*, *Itgav*, *Itgax*).



19. ábra. Pluripotencia gének és a korai mesoderma marker *T* gén kifejeződése a különböző MSC populációkban. A relatív mRNS szinteket ebben az esetben az R1 egér ES sejtvonalon mért értékekhez képest határoztuk meg. (A) Egyik MSC populáció sem expresszál kimutatható mennyiségű *Oct4*, *Nanog*, vagy *Rex1* (*Zfp42*) specifikus mRNS-t, ugyanakkor a *Klf4* gén minden MSC populációban markánsan kifejeződik. (B) A *Brachyury* (*T*) génről átíródott mRNS mennyisége is csak minimális – a kimutathatóság határán van - a sejtekben.



20. ábra. Mesenchymalis és mesodermális markerek kifejeződése a különböző MSC populációkban. A *Colla1*, *Vim* és *Acta2* (A), valamint a *Gata6*, *Gata4* és *Nkx2.5* (B) gének expressziójára vonatkozó adatok feldolgozása és ábrázolási módja megegyezik 14.A ábránál leírtakkal. (C) Az α -simaizom aktin fehérje kimutatása immunfluoreszcens módszerrel, Cy3-mal konjugáltatott anti- α SMA ellenanyag segítségével történt. A sejtmagokat DAPI-val jelöltük (eredeti nagyítás 20x-os).



21. ábra. **Hox** gének kifejeződése a különböző MSC populációkban. Az „a” (*Hoxa1,7,9*) (A), a „b” (*Hoxb1,2,3,4,7,8,9*) (B), a „c” (*Hoxc6,8,9,10,11,12,13*) (C) és a „d” (*Hoxd1,3,4,8,9,12,13*) klaszterek tagjainak expressziójára vonatkozó adatok feldolgozása és ábrázolási módja megegyezik 14.A ábránál leírtakkal.

4.3.2. Egyéb, homeodomén-tartalmú transzkripciós faktorok kifejeződése az őssejtekben

Az egér *Homeobox (HOX) Genes PCR Array* segítségével kimutatható egyéb homeodomén tartalmú transzkripciós faktorok közül 21 (*Arx*, *Barx1*, *Cdx1*, 2, 4, *Dmbx1*, *Emx1*, *Hopx*, *Lbx1*, *Lmx1a*, 1b, *Nkx3-1*, *Otx2*, *Pdx1*, *Phox2b*, *Pitx3*, *Prop1*, *Six3*, *Vax1*, és *Vsx1*) nem fejeződik ki az MSC-kben. További 30, a test mintázatának kialakításban, a morfogenezisben, és más fejlődési folyamatokban kulcsszerepet játszó transzkripciós faktor (*Alx1*, 3, 4, *Dlx2*, 3, 4, 5, 6, *Emx2*, *En1*, *Hhex*, *Isl1*, *Isl2*, *Lbx2*, *Lhx1*, *Meis1*, *Meox1*, *Mixl1*, *Msx1*, 2, *Otp*, *Otx1*, *Pax3*, *Pitx2*, *Prox1*, *Shox2*, *Six1*, 2, 6, és *Vax2*) expressziója változó a különböző eredetű MSC populációkban. Az agynak, a craniofaciális terület egyes csontjainak, és a lábknak a kialakításában – de legfőképpen a chondrocyta fejlődésben – érintett *Alx1* gén (Beverdam A and Meijlink F, 2001) például jóval magasabb szinten fejeződik ki a Cs- és Th-MSC-kben (100x, $P=0,014$, ill. 1000x, $P=0,003$), mint a FCs-MSC-kben. A fejlődő velőcsőben és a somitákban egyaránt előforduló *Pax3* (Buckingham M and Relaix F, 2007) expressziója viszont az Ao-, Cs-, és Lp-MSC-kben magasabb (100x, $P=0,006$), mint a többi mintában (nem mutatjuk).

Négy olyan homeodomén tartalmú transzkripciós faktort találtunk, amelyeknek a génje minden vizsgált MSC populációban erőteljesen kifejeződött. Ezek a citoszkeleton átrendeződésében, a sejt-sejt és sejt-mátrix kölcsönhatások, valamint az epitheliális-mesenchymalis tranzíció (EMT) szabályozásában (Sansregret L and Nepveu A, 2008) részt vevő *cut-like homeobox 1 (Cux1)*, a vázrendszer kialakításában érintett (Kraus P and Lufkin T, 2006) *distal-less homeobox 1 (Dlx1)*, a somitákban és a végtag bimbókban expresszáldó (Kumar JP, 2009) *sine oculisrelated homeobox 4 (Six4)*, és a *mohawk homeobox (Mkx)* gének voltak (22A ábra). Az először a somitákban megjelenő, majd a felnőtt szervezetben elsősorban az inakban kifejeződő (Anderson DM et al, 2006; Ho Y et al, 2010) *Mkx* gén által kódolt fehérje jelenlétét immunhisztokémiai módszerrel is igazoltuk a különböző MSC populációkban (nem mutatjuk).

Talán a legfontosabb azonban, hogy minden mintában kifejeződnek olyan transzkripciós faktorok is, amelyek jellemzően egy-egy testtáj, illetve testszelvény kialakulásában játszanak meghatározó szerepet. A *T-box 5 (Tbx5, Brachyury)* gén, aminek a mellső végtagok (ill. karok) és a szív fejlődésében van meghatározó szerepe (Chapman DL, 1996; Wardle FC and Papaioannou VE, 2008), a Th-MSC-kben jóval erőteljesebben expresszáldódik, mint a többi mintában ($P=0,037$). Hasonlóan, az *Engrailed homeobox 2 (En2)* gén expressziója az Ao-MSC-kre, a lép primordium kialakulásában kulcsszerepet játszó *T-cell leukemia homeobox 1 (Tlx1)* géné (Brendolan A et al, 2007) pedig a Lp-MSC-

kre jellemző (a többi mintához viszonyítva $P=0,028$, ill. $P=0,017$). A hátsó végtagok fejlődésének szabályozásában kulcsszerepet játszó (Duboc V and Logan MP, 2011) *paired-like homeodomain transcription factor 1* (*Pitx1*) gén mRNS-e pedig csak a combcsontból izolált FCs-és Cs-MSC-kben mutatható ki szignifikáns mennyiségben ($P=0,024$) (22B ábra). E négy transzkripciós faktor expresszióját az MSC-kben fehérje szinten is igazoltuk (22C ábra). Mindezek alapján tehát megállapíthatjuk, hogy a különböző szervekből és szövetekből származó MSC-k lehetnek ugyan közös eredetűek, fejlődésük (érésük) egy meghatározó szakasza mindenképpen ahhoz a testszelvényhez (somitához?) köthető, amelyből izoláltuk őket. Génexpressziós mintázatuk – amit *in vitro* kultúrában is hosszú ideig (a 10-15. átoltásig) megőriznek - egyértelműen tükrözi regionális identitásukat.

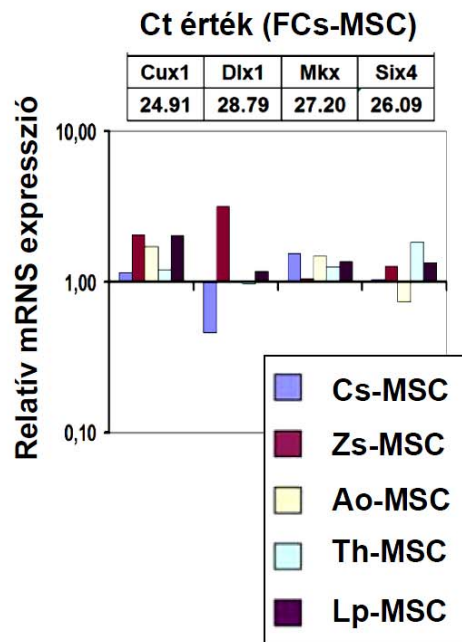
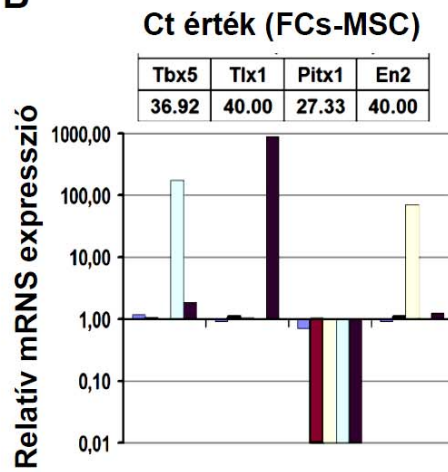
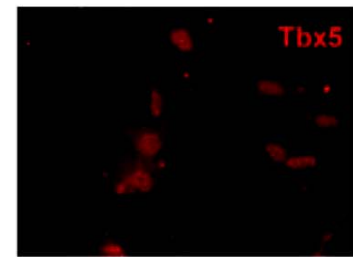
4.4. A mesenchymalis őssejtek funkciója

Az MSC-k számos – részben csak feltételezett – funkciója közül elsősorban a vérképzés támogatásában betöltött szerepüket, gyulladásgátló és immunszuppresszív aktivitásukat, valamint *in vivo* regeneratív képességüket vizsgáltuk különböző *in vitro* és *in vivo* modell rendszerekben.

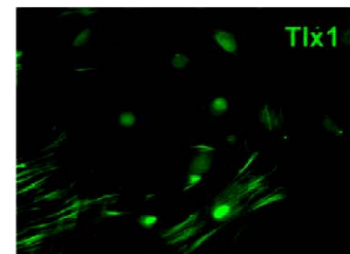
4.4.1. A hematopoézis támogatása – a vérképző őssejt „niche” kialakítása

A vérképző őssejtek csontvelői mikrokozonyzatának – a hematopoetikus őssejt „niche”-nek – a kialakításában résztvevő sejtek tetemes része (a CXCL12-ben gazdag retikuláris (CAR) sejtek, osteoblastok, adipocyták, fibroblastok) MSC eredetű. Ezek a stroma sejtek részben közvetlen sejt-sejt kölcsönhatások, részben az általuk termelt szolubilis és/vagy az extracelluláris mátrixhoz kötött mediátorok segítségével befolyásolják - vagy inkább irányítják – a vérképző ős- és elődsejtek sorsát (Morrison SJ and Spradling AC, 2008).

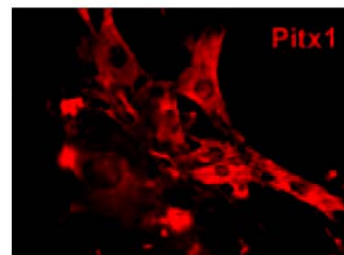
22. ábra. **Egyéb, homeodomén-tartalmú transzkripciós faktorokat kódoló gének kifejeződése a különböző MSC populációkban.** A *Cux1*, *Dlx1*, *Mkx* és *Six4* (A), valamint a *Tbx5*, *En2*, *Tlx1* és *Pitx1* (B) gének expressziójára vonatkozó adatok feldolgozása és ábrázolási módja megegyezik 14.A ábránál leírtakkal. (C) A *Tbx5*, *Tlx-1*, *Pitx1* és *En2* fehérjék jelenlétét a thymus, lép, csontvelő, illetve aorta fal eredetű MSC-kben immunfluoreszcens módszerrel is igazoltuk. Az adott transzkripciós faktorra specifikus első – kecske vagy nyúl - ellenanyagokat NL557-el jelölt számár anti-kecske, illetve Alexa488-al konjugáltatott kecske anti-nyúl ellenanyagok segítségével tettük láthatóvá (eredeti nagyítás 20x-os).

A**B****C**

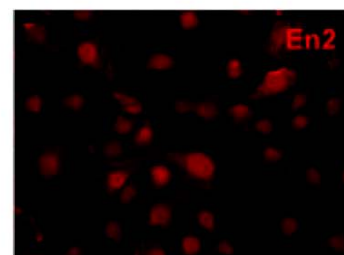
Th-MSC



Lp-MSC



FCs-MSC



Ao-MSC

4.4.1.1. A Jagged1 Notch-ligandum szerepe a vérképző ős- és elődsejtek osztódásának és differenciálódásának szabályozásában

Az egyik legfontosabb, a stroma sejtek és a vérképző elemek közti közvetlen kölcsönhatást biztosító jeltovábbító rendszer a Notch. Mivel a csontvelői stroma sejtek felszínén a Notch ligandumok közül legnagyobb mennyiségben a Jagged 1 molekulák fejeződnek ki, és mivel ezeknek a szerepét a vérképzés szabályozásában *in vivo* is sikerült igazolni (Weber JM and Calvi LM, 2010), részletesen megvizsgáltuk a szolubilis és a Sepharose-4B gyöngyök felületén inszolubilizált Jagged 1 fehérjének – pontosabban a ligandum extracelluláris doménjének (sJG1^{ECD}) - a hematopoetikus ős- és elődsejtek osztódására és differenciálódására gyakorolt hatását.

Elsőként a szolubilis (monovalens) és az inszolubilizált (multivalens) ligandumnak a friss csontvelőben található elkötelezett elődsejtek kolóniaképzésére gyakorolt hatását tanulmányoztuk. Mint a 8. táblázat mutatja, a megfelelő induktorokat (citokineket) tartalmazó lágy gél kultúrákban a ligandum mindkét formában szignifikánsan megnövelte a CFU-GEMM, CFU-GM, és BFU-E számot. Ugyanakkor citokineket nem tartalmazó gélben a rekombináns sJG1^{ECD} jelenlétében sem történt kolóniaképzés, azaz a JG1 fehérje egy gyenge növekedési faktor, vagy inkább kofaktor, a különböző sejtfejlődési sorok irányába elkötelezett elődsejtek számára.

8. táblázat. A Jagged-1 mono- és multivalens formában egyaránt fokozza a vérképző elődsejtek kolóniaképzését lágy gél kultúrában^a

Notch ligandum	Kolóniaszám /10 ⁵ csontvelői magvas sejt		
	CFU-GEMM	CFU-GM	BFU-E
-	33,3 ± 3,0	104,0 ± 6,0	71,7 ± 4,1
sJG1 ^{ECD} (µg/ml)			
10,0	56,7 ± 5,0*	152,7 ± 6,1*	85,0 ± 5,2*
5,0	58,3 ± 3,5*	145,3 ± 12,8*	80,0 ± 3,6*
2,5	55,0 ± 3,4*	124,7 ± 12,2	66,7 ± 6,4
0,625	50,0 ± 3,4*	106,7 ± 5,0	68,3 ± 4,5
0,156	35,0 ± 5,2	99,3 ± 5,5	70,0 ± 5,2
sJG1 ^{ECD} -Sepharose-4B			
(10 000 gyöngy/kultúra)	51,7 ± 4,9*	134,7 ± 5,0*	81,7 ± 4,6*

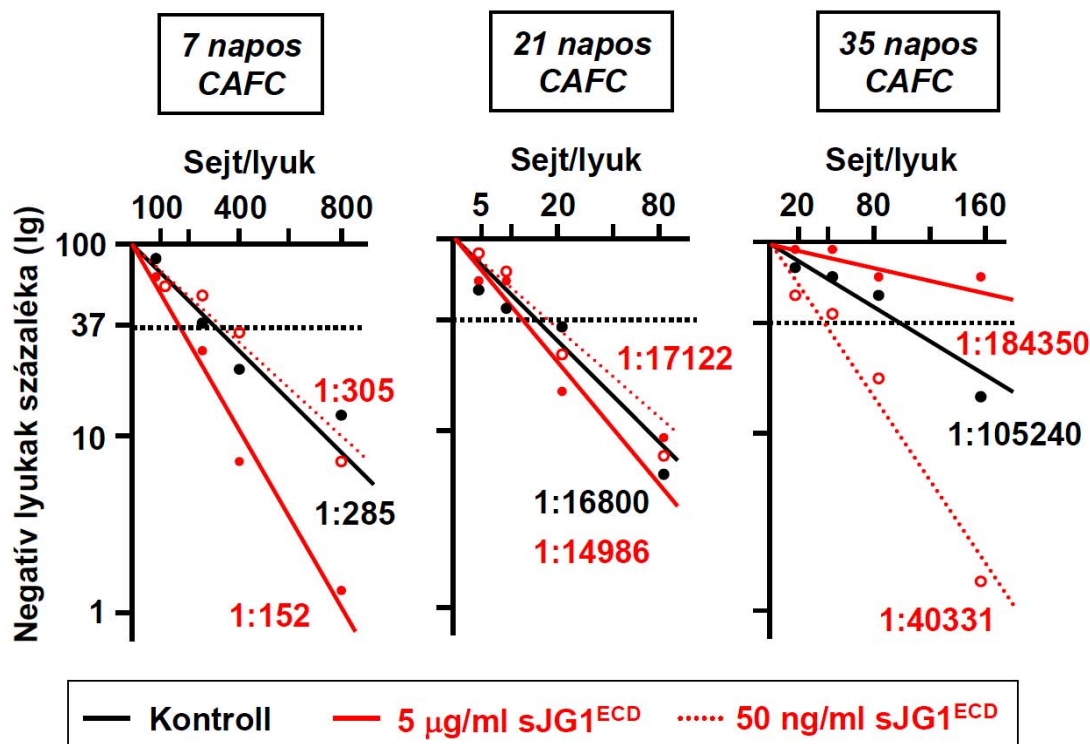
^aÖt kísérlet átlaga ± szórás; * p < 0,05.

„Macskakő” kultúrában viszont, ami a vérképző őssejt rendszer korstruktúrájának a vizsgálatára (is) alkalmas, a szolubilis ligandumnak részben bifázisos hatása van. Ha magas (5-10 $\mu\text{g/ml}$) koncentrációban adtuk az sJG1^{ECD}-t a tenyészetekhez, akkor a 7-napos CAFC frekvencia – ami tulajdonképpen a lágy gél kultúrában is kimutatható elkötelezett elődsejtek gyakoriságával azonos – szignifikánsan nőtt, a 35-napos CAFC frekvencia viszont - ami már inkább a HSC-k gyakoriságát mutatja - erősen csökkent. Alacsony (50 ng/ml) koncentrációjú sJG1^{ECD} azonban szignifikánsan növelte a 35. napon „macskakő” kolóniát képző sejtek arányát. A 21-napos CAFC gyakoriságot a szolubilis ligandum egyik koncentrációban sem befolyásolta (23. ábra). Hasonló eredményt kaptunk, amikor megismételtük a kísérletet a csontvelői magvas sejtek Lin⁻ frakciójával. Ebben a 35. napon „macskakő” kolóniát képző fiatal sejtek aránya jóval magasabb volt, mint a nem szeparált csontvelőben. Itt 1 kolóniaképző sejt jutott 400-1000 Lin⁻ sejtre, míg a nem szeparált csontvelőben ez az arány 1:80 000-100 000 volt. Az sJG1^{ECD} magas koncentrációban csökkentette, alacsony koncentrációban viszont növelte a 35-napos CAFC frekvenciát (24A ábra). A következő lépésben a besugárzott stroma réteget csak előkezeltük (1 óra, 37°C) magas (5 $\mu\text{g/ml}$) koncentrációjú sJG1^{ECD}-vel, majd lemostuk a tenyésztőtálcákat, és csak ezután szélesztettük a Lin⁻ csontvelői sejteket. Ilyenkor a 35-napos CAFC gyakoriság a kezeletlen kontroll mintákhoz képest mintegy a kétszeresére nőtt a kultúrákban (24B ábra). Feltehető tehát, hogy a sJG1^{ECD} fehérje kis mennyiségben képes kötődni a stroma sejtek felszínéhez, és a stroma sejtek által kifejezett JG1 molekulákkal együtt – multivalens formában – képes fokozni a vérképző őssejtek osztódását. Ezzel szemben a nagy mennyiségű sJG1^{ECD} fehérje gátolhatja a multivalens forma által indukált sejtosztódást.

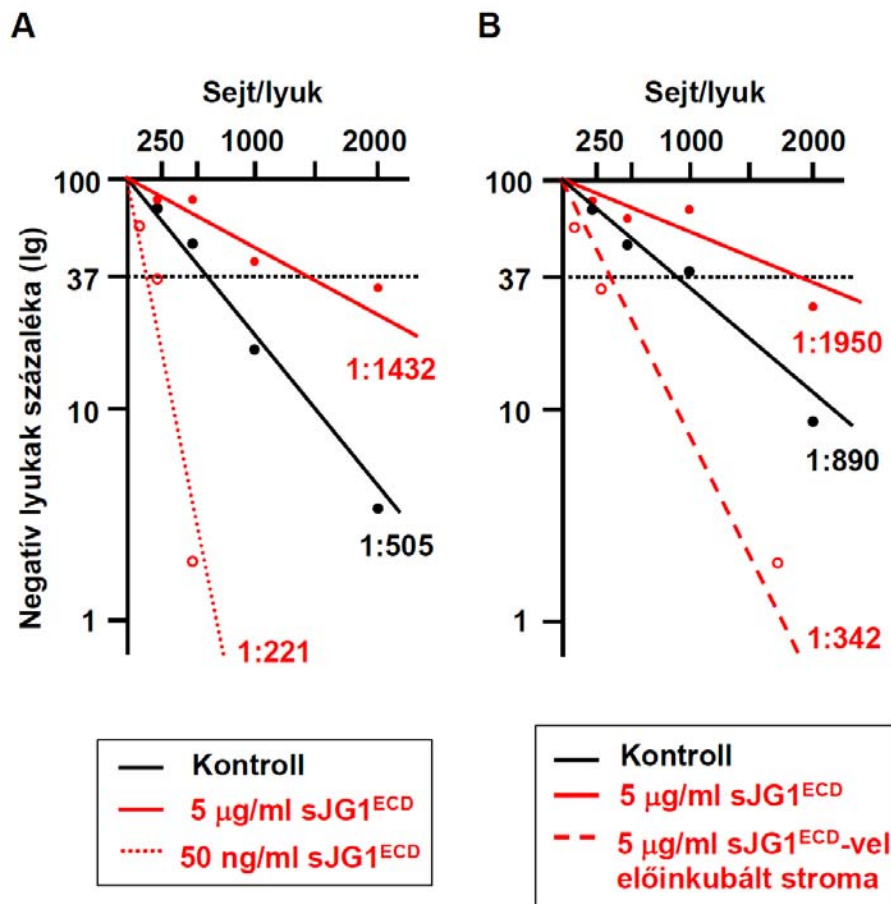
Ennek igazolására olyan, stromasejtmentes kultúrákat állítottunk össze, amelyekben a Lin⁻ vérképző sejteket rekombináns őssejt faktor (SCF), Flk-2/Flt-3 ligandum (FL), és trombopoetin (TPO), valamint szolubilis, vagy Sepharose-4B gyöngyök felületén inszolubilizált JG1^{ECD} jelenlétében, illetve hiányában tenyésztettük. A kontroll – növekedési faktort nem tartalmazó – kultúrákban folyamatos sejtpusztulást tapasztaltunk, míg az SCF, FL, és TPO egyidejű jelenlétében a magvas sejtek száma – átmeneti csökkenés (7. nap) után – a második hét végére jelentősen emelkedett. A legnagyobb mértékű sejtszám növekedést azokban a kultúrákban kaptuk, amelyekben a három növekedési faktoron kívül sJG1^{ECD}-Sepharose-4B gyöngyök is jelen voltak (9. táblázat). A 35-napos CAFC kolóniát képző sejtek gyakoriságának vizsgálata viszont azt mutatta, hogy

a csak három növekedési faktort, vagy a három rekombináns citokin mellett sJG1^{ECD}-t is tartalmazó kultúrákból kikerült sejtek között a kolóniaképző sejtek gyakorisága jelentősen csökkent a kiindulási értékhez képest (1:996-2455 vs. 1:418). Ugyanakkor az SCF, FL, TPO, és sJG1^{ECD}-Sephacrose-4B jelenlétében tenyésztett sejtpopulációban két hét után sem tapasztaltunk hasonló, szignifikáns csökkenést a 35-napos CAFC kolóniát képző sejtek frekvenciájában (1:356 vs. 1:418). Mivel az utóbbi kultúrákban a magvas sejtek abszolút száma is jelentősen megnőtt, összességében elmondhatjuk, hogy multivalens JG1 ligandum jelenlétében a három növekedési faktor indukálta sejtosztódás során mintegy 16-szorosára nőtt az *in vitro* kultúrában kimutatható legfiatalabb vérképző (ős)sejtek mennyisége. A multivalens JG1 ligandumnak ezt a kedvező hatását az sJG1ECD dóziszfüggően gátolta (10. táblázat).

Természetesen felvetődött a kérdés, hogy az SCF, FL, TPO, és sJG1ECD-Sephacrose-4B egyidejű jelenlétében valóban keletkeznek-e új, „jó minőségű”, *in vivo* tartós repopulációra képes HSC-k (LTRA sejtek) is a tenyészetekben. Ennek kiderítésére letálisan besugárzott (9Gy) nőstény egereket 800, illetve 4000, hím állatok csontvelőjéből származó és 14 napig kultúrában tartott Lin⁻ sejtrel, valamint 2×10^5 „legyengített” (korábban már háromszor átoltott), nőstény egerekből vett friss csontvelői sejtrel oltottunk intravénásan. Tíz hónappal a transzplantáció után az elsődleges recipienseket feláldoztuk, és 10^6 csontvelői magvas sejtjüket újabb, myeloablatált nőstény állatokba oltottuk. Hat hónapos regeneráció után PCR módszerrel – a *zfy* szekvenciára specifikus primer segítségével – vizsgáltuk az Y kromoszómát hordozó vérképző sejtek jelenlétét e másodlagos recipiensekben. Mint a 25. ábra mutatja, ha SCF, FL, TPO, és sJG1^{ECD}-Sephacrose-4B egyidejű jelenlétében 14 napig kultúrában tartott Lin⁻ sejtekkel oltottuk az úlső állatokat, akkor a másodlagos recipiensek csontvelőjében is kimutathatók voltak Y kromoszómát hordozó vérképző sejtek (800 sejt esetén 5 egerből 4, 4000 sejt esetén 5 egerből 5 volt pozitív). A csak a három növekedési faktort, vagy a citokineket és sJG1^{ECD}-t tartalmazó tenyészetekből származó sejteket transzplantálva viszont csak egy-egy másodlagos recipiens csontvelője bizonyult pozitívnak. A kimerizmust Y kromoszóma specifikus FISH-el is igazoltuk (nem mutatjuk). A JG1 tehát multivalens formában – és megfelelő növekedési faktorok egyidejű jelenlétében – képes önfenntartó osztódásra készíteni a legfiatalabb, tartós repopulációra képes HSC-ket is.



23. ábra. Az sJG1^{ECD} hatása az egér csontvelői magvas sejtek CAFC kolóniaképzésére. 96-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon létrehozott konfluens stroma rétegre a vizsgálandó sejtek különböző – előkísérletekben meghatározott - hígításait pipettáztuk, majd 33°C-os CO₂-termosztátban inkubáltuk a tálcákat. A stroma réteg alatt CAFC médiumban, illetve a tenyésztőfolyadék és 50 ng/ml, vagy 5 µg/ml sJG1^{ECD} egyidejű jelenlétében növekedő „macskakő” kolóniákat nem tartalmazó lyukakat minden héten inverz mikroszkópban leszámoltuk. A CAFC gyakoriságokat és a szignifikancia értékeket az L-Calc szoftver segítségével számítottuk ki. Háromból egy reprezentatív kísérlet eredménye.



24. ábra. Az sJG1^{ECD} hatása az egér csontvelői Lin⁻ sejtek CAFC kolóniaképzésére. (A) 96-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon létrehozott konfluens stroma rétegre a vizsgálandó csontvelői Lin⁻ sejtek különböző – előkísérletekben meghatározott - hígításait pipettáztuk, majd 33°C-os CO₂-termosztátban inkubáltuk a tálcákat. A stroma réteg alatt CAFC médiumban, illetve a tenyésztőfolyadék és 50 ng/ml, vagy 5 µg/ml sJG1^{ECD} egyidejű jelenlétében növekedő „macskakő” kolóniákat nem tartalmazó lyukakat minden héten inverz mikroszkópban leszámoltuk. (B) Ugyanezt a kísérletet megismételtük úgy, hogy a stroma réteget csak előinkubáltuk magas koncentrációjú (5 µg/ml) sJG1^{ECD}-vel. A CAFC gyakoriságokat és a szignifikancia értékeket az L-Calc szoftver segítségével számítottuk ki. Háromból egy reprezentatív kísérlet eredménye.

9. táblázat. A *mutivalens Jagged-1* hatása a korai (Lin⁻) vérképző ős- és elődsejtek osztódására *in vitro* kultúrában^a

Idő (nap)	Eredmények	Kultúra körülmények			
		Médium	SCF+FL+ TPO+ sJG1 ^{ECD} - Seph-4B	SCF+FL+ TPO+ sJG1 ^{ECD}	SCF+FL+ TPO
0	<i>Sejtszám/kultúra</i>	5000			
	35-napos CAFC gyakoriság	1:418			
	35-napos CAFC kolónia/ kultúra	12,0			
	<i>Az (ős)sejtek relatív mennyisége</i>	1,00			
7	<i>Sejtszám/kultúra</i>	2750	1900	3460	2900
	35-napos CAFC gyakoriság	1:2455	1:198	1:996	1:842
	35-napos CAFC kolónia/ kultúra	1,1	9,6	3,5	2,4
	<i>Az (ős)sejtek relatív mennyisége</i>	0,09	0,80	0,29	0,28
14	<i>Sejtszám/kultúra</i>		68 600	42 500	43 000
	35-napos CAFC gyakoriság	Nem	1:356	1:4642	1:4314
	35-napos CAFC kolónia/ kultúra	vizsgál- ható	192,7	9,2	10,0
	<i>Az (ős)sejtek relatív mennyisége</i>		16,06	0,77	0,83

^aEgy reprezentatív kísérlet eredménye (n=3).

10. táblázat. A vérképző őssejtek multivalens Jagged-1 jelenlétében bekövetkező önfenntartót osztódása a ligandum szolubilis formájával gátolható^a

Notch ligandum(ok)		35-napos CAFC gyakoriság
<i>sJGI^{ECD}</i> – <i>Sepharose-4B</i> (gyöngyök száma/kultúra)	<i>sJGI^{ECD}</i> (μg/ml)	
-	-	1:5236
10 000	-	1:449
10 000	18,0	1:1490*
10 000	9,0	1:934
10 000	4,5	1:527
2000	-	1:694
2000	18,0	1:3130*
2000	9,0	1:1321*
2000	4,5	1:810
-	18,0	1:6905

^aHárom kísérlet átlaga ± szórás.

* $p < 0,05$.

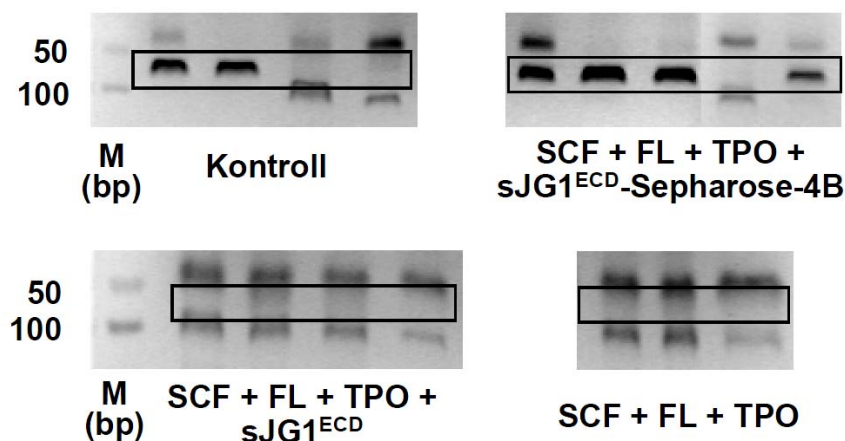
4.4.1.2. A Notch-rendszer működési zavara myelodysplasiás betegekben

Amikor myelodysplasiás (MDS) betegek (11. táblázat) csontvelő mintáiból izolált MSC-k tenyésztését hasonlítottuk össze egészséges csontvelő donorokéval, megállapítottuk, hogy a MDS betegekből származó stroma tenyészetek, az egészséges emberek MSC-iből kialakított stroma rétegekhez képest morfológiailag kevésbé egységes képet mutatnak, lassabban növekednek, erősen apoptotikusak és általában nem, vagy legalábbis nehezen érik el a konfluenciát. A betegekből származó MSC-k plaszticitása is korlátozott, felszíni markereik azonban nem különböznek a kontroll sejtektől (nem mutatjuk).

A

Primer kultúra	Másodlagos recipiensek/ Y pozitív recepiensek	
	800 Teszt sejt/állat	4000 Teszt sejt/állat
Kontroll (friss BMC)	4/2	5/4
SCF + FL + TPO + sJG1 ^{ECD} -Seph-4B	5/4	4/4
SCF + FL + TPO + sJG1 ^{ECD}	4/0	3/1
SCF + FL + TPO	3/0	5/1

B



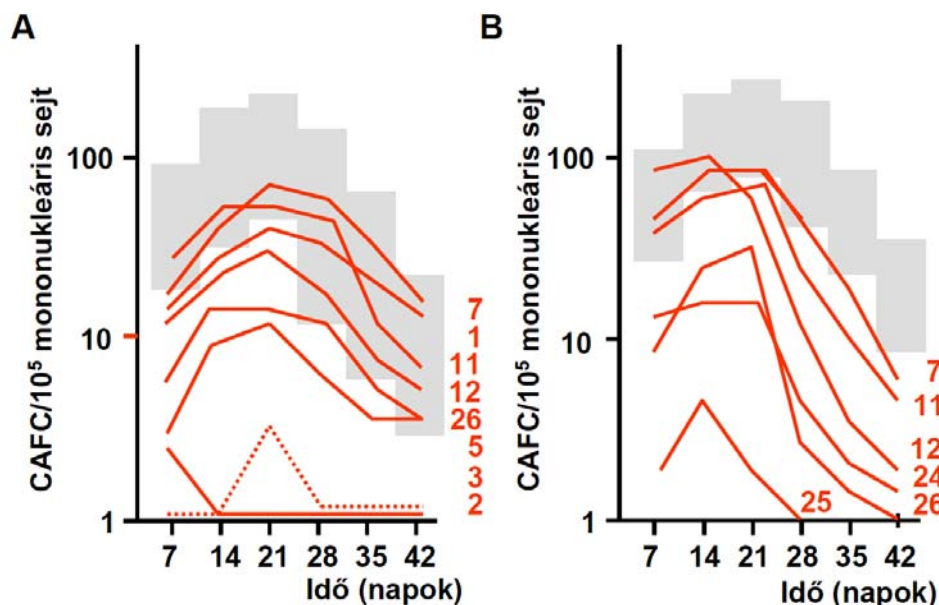
25. ábra. A multivalens Jagged-1 ligandum elősegíti a tartós repopulációra képes véréképző őssejtek (LTRA-HSC) önfenntartó osztódását. A vizsgálandó, hím egerek csontvelőjéből izolált Lin⁻ sejteket korai citokinek (SCF, FL és TPO), valamint szolubilis (sJG1^{ECD}), illetve inszolubilizált (sJG1^{ECD}-Sepharose-4B) Jagged-1 jelenlétében két hétig tenyésztettük *in vitro* kultúrában, majd myeloablatált nőstény recipiensekbe oltottuk őket. A csontvelő regenerációja után (3 hónap) 800, illetve 4000 csontvelői magvas sejtet továbboltottunk másodlagos – ugyancsak nőstény - recipiensekbe. Újabb 3 hónap elteltével vizsgáltuk, hogy megjelennek-e Y kromoszómát hordozó, azaz donor eredetű sejtek az állatok véréképző rendszerében. A hím eredetű véréképző sejteket Y kromoszóma specifikus FISH (A), valamint Zfy gén specifikus PCR (B) segítségével mutattuk ki a csontvelő mintákban.

11. táblázat. Az MDS páciensek legfontosabb adatai

Páciens	Kor	Nem	WHO besorolás
MDS-1	71	Férfi	RA
MDS-2	80	Férfi	RARS
MDS-3	90	Férfi	RAEB II.
MDS-5	84	Nő	RA
MDS-7	68	Nő	RA
MDS-11	78	Férfi	RARS
MDS-12	51	Férfi	RAEB I.
MDS-24	66	Nő	RAEB I.
MDS-25	58	Férfi	Post-MDS-AML
MDS-26	68	Férfi	RARS

AML, akut myeloid leukaemia; RA, refrakter anaemia; RAEB, refrakter anaemia blast szaporulattal; RARS, refrakter anaemia gyűrűs sideroblastokkal.

Vérképzést támogató képességük összehasonlítását CAFC módszerrel végeztük. (Emberben – az egértől némiképp eltérően - az elkötelezett vérképző elődsejtek 7-14 nap után képeznek kolóniát (7-14 napos CAFC), míg a fiatalabbős- és korai elődsejtek csak 5-6 hét után kezdenek osztódni (35-42 napos CAFC). A következő kultúrákat mértük össze: normál kontroll mononukleáris sejtek (MNC) normál stroma rétegen (kontroll), MDS-es csontvelőből származó MNC-k normál stromán, normál MNC-k MDS-es stromán, és MDS-es MNC-k beteg stromán szélesztve. Amikor az MDS-MNC-ket normál MSC rétegen tenyésztettük, akkor 8-ból 4 betegnél mind a korai, mind a késői CAFC gyakoriság szignifikánsan csökkent a kontroll értékekhez képest (26A. ábra). Fordított esetben 6-ból 5 mintánál (ebből négyenél igen jelentősen) csökkentek a CAFC gyakoriságok a kontrollhoz képest (26B. ábra). Ha MDS-MNC-ket MDS-stromával inkubáltunk, a 7 és 14 napos CAFC gyakoriság minimálisra csökkent, a 24-42 napos tenyészetekben pedig általában egyáltalán nem tudtunk kolóniaképző sejteket kimutatni (az adatokat nem mutatjuk). Mindez azt mutatja, hogy az MDS kórlefolásában – a vérképző sejtek klonális megbetegedése mellett - a hematopoetikus mikrokörnyezet, illetve az ezt létrehozó MSC-k károsodása is szerepet játszik.



26. ábra. Egészséges donorok és MDS betegek csontvelői sejtjeinek CAFC kolóniaképzése. (A) MDS betegek csontvelői mononukleáris sejtjeinek növekedése egészséges csontvelő mintából előállított stroma rétegen (n=8); és megfordítva, (B) egészséges csontvelői mononukleáris sejtek kolóniaképzése MDS stromán (n=6). A szürke árnyalatú terület a normális kontroll (egészséges MNC + egészséges stroma) tartományt mutatja. A piros görbék egy-egy, a számmal jelzett beteg adatait mutatják.

A szolubilis JG1^{ECD} fehérjének – az egér macskakő kultúrákban megfigyeltékhez hasonlóan – a humán rendszerben is bifázisos hatása van, legalábbis a normál kontroll MNC-ket és stroma sejteket tartalmazó kultúrákban. Ezekben a tenyészetekben a 7-14-napos CAFC gyakoriság szignifikánsan emelkedett, a 35-42-napos CAFC frekvencia viszont csökkent 5,0 $\mu\text{g/ml}$ sJG1^{ECD} jelenlétében. A 7-napos CAFC kolóniaképző sejtek gyakorisága az MDS betegekből izolált sejteket tartalmazó kultúrákban is emelkedik a szolubilis ligandum jelenlétében, kivéve azokat a betegmintákat, amelyekben eleve igen alacsony (<9 CAFC/10⁵ MNC) volt a kolóniaképző sejtek gyakorisága (12. és 13. táblázat). A 42-nap után CAFC kolóniát képző sejtek frekvenciáját viszont az MDS-MNC-ket és normál MSC-ket tartalmazó kultúrákban az sJG1^{ECD} nem gátolja (sőt enyhén, nem szignifikánsan fokozza) (12. táblázat), míg a kontroll MNC-ket és MDS-stromát tartalmazó kultúrákban a gátlás ismét jelentkezik (13. táblázat). A szolubilis Notch ligandum tehát (i) növekedési (ko)faktor mind az egészséges donorokból, mind az MDS betegekből izolált elkötelezett vérképző elődsejtek (7-14-napos CAFC) számára, (ii) gátolja viszont az

egészséges vérképző ős- és korai elődsejtek (35-42-napos CAFC) osztódását normál és MDS-stromán, de (iii) nem tudja csökkenteni az MDS-MNC-kból 42 nap után, preformált stroma rétegen kifejlődő kolóniák gyakoriságát. Utóbbi megállapításunk igazolására három MDS betegből és egy egészséges csontvelő donorból izolált MNC-ket normál stroma rétegen szélesztettünk különböző mennyiségű SJG1^{ECD} jelenlétében, majd a 35. napon meghatároztuk a CAFC kolóniaképző sejtek frekvenciáját a tenyészetekben. Mint a 3. ábra mutatja, a rekombináns fehérje az egészséges donorból származó MNC-k kolóniaképzését dóziszfüggően gátolja, de a betegek MNC-inek kolóniaképzését nem befolyásolja. Az MDS betegek csontvelőjében tehát a stroma sejtek és a vérképző elemek közti, Notch-Jagged-1 közvetített kölcsönhatás zavart szenved, ami feltehetően hozzájárul a betegség kialakulásához.

4.4.1.3. A galektin-1 szerepe a hematopoézisben és a vérképző sejtek mobilizációjában

Mivel a galektin-1 (Gal-1) fehérje erőteljes immunszuppresszív és gyulladásgátló aktivitással rendelkezik, ráadásul nagy mennyiségben termelődik az MSC-kben és a belőlük származó egyéb csontvelői stroma sejtekben (Rabinovich G and Vidal M, 2011), megvizsgáltuk, hogy befolyásolja-e a vérképző ős- és elődsejtek osztódását, differenciálódását, illetve mobilizációját. Mint a 27A, B ábra mutatja, a rekombináns Gal-1 jól kötődik az egér csontvelői magvas sejtek több mint 70, sőt, a Lin⁻ frakció esetében közel 100 százaléka. A Gal-1 molekulák a cukorkötő helyükön keresztül kapcsolódnak a sejtekhez, mivel magas koncentrációjú (100 mM) laktózzal leszoríthatók a membránról. Lágy gél kultúrákban a Gal-1, legalábbis alacsony (10-10 ng/ml) koncentrációban, fokozta az elkötelezett vérképző elődsejtek osztódását, míg magas (10 µg/ml) lektin koncentráció esetén kolóniaképzést (CFU-GM és BFU-E) egyáltalán nem tapasztaltunk (14. táblázat). A lektinnek tehát dóziszfüggő, bifázisos hatása van a granulocita-macrophag- és erythroid-kolóniaképző sejtekre. „Macskakő”-kultúrában vizsgálva a különböző korú vérképző sejtek osztódását, hasonló eredményt kaptunk. A Gal-1 – alacsony (20 ng/ml) koncentrációban – fokozta a 7-napos, de nem befolyásolta a 35-napos CAFC kolóniaképző sejtek gyakoriságát. A 21-napos CAFC frekvencia viszont csökkent a lektin jelenlétében (28. ábra). A 35-napos CAFC frekvenciát a kevés Gal-1 akkor sem növelte szignifikánsan, amikor a kísérletet megismételtük Lin⁻ sejtekkel. Magas (10 µg/ml) Gal-1 koncentrációt alkalmazva egyik időpontban sem tapasztaltunk értékelhető CAFC kolóniaképződést. (Ugyanezeket a vizsgálatokat emberi csontvelőből izolált sejtekkel is elvégeztük, és hasonló eredményeket kaptunk (nem mutatjuk)).

12. táblázat. Szolubilis Jagged-1 hatása az MDS páciensek csontvelői mononukleáris sejtjeinek CAFC kolóniaképzése normál stroma rétegen^a

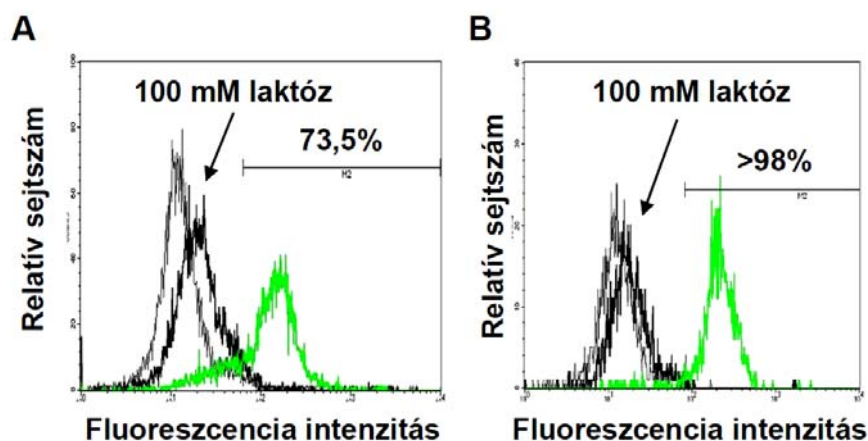
Páciens	7-napos CAFC/ 10 ⁵ csontvelői MNC		42-napos CAFC/ 10 ⁵ csontvelői MNC	
	<i>Médium</i>	<i>sJGI^{ECD}</i>	<i>Médium</i>	<i>sJGI^{ECD}</i>
		(5 µg/ml)		(5 µg/ml)
MDS-7	17	25	15	12
MDS-1	16	33	13	21
MDS-11	29	41	7	11
MDS-12	14	29	5	9
MDS-26	12	22	5	9
MDS-5	3	1	4	5
MDS-3	0	1	0	1
MDS-2	3	1	0	2

^aEgy reprezentatív kísérlet eredménye (n=3).

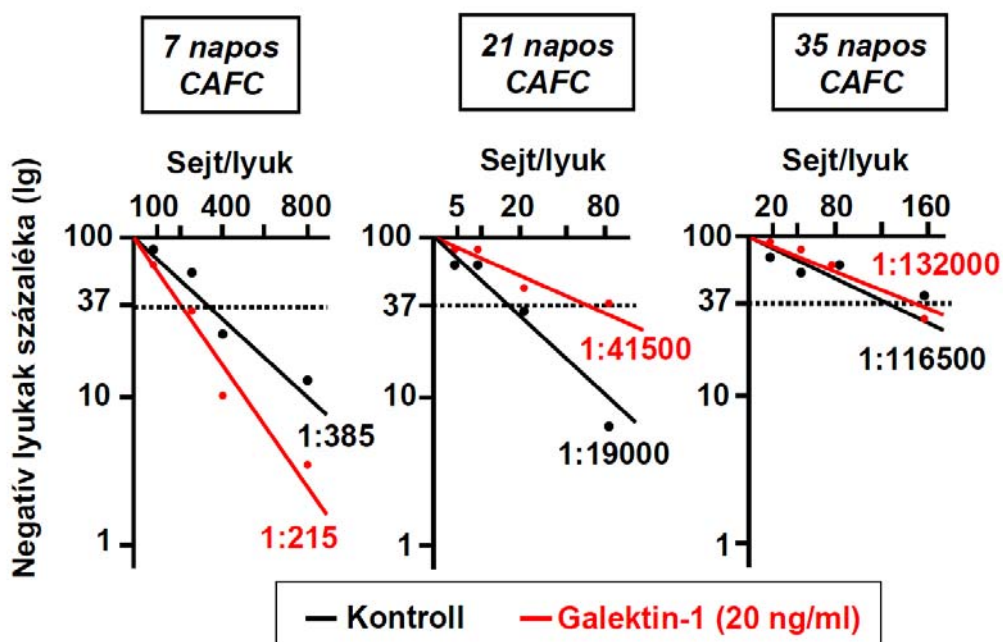
13. táblázat. Szolubilis Jagged-1 hatása normál donorokból származó csontvelői mononukleáris sejtek CAFC kolóniaképzésére MDS stroma rétegen^a

Páciens	7-napos CAFC/ 10 ⁵ csontvelői MNC		35-napos CAFC/ 10 ⁵ csontvelői MNC	
	<i>Médium</i>	<i>sJGI^{ECD}</i>	<i>Médium</i>	<i>sJGI^{ECD}</i>
		(5 µg/ml)		(5 µg/ml)
MDS-7	79	142	12	6
MDS-11	71	123	10	2
MDS-12	91	134	4	1
MDS-24	11	22	2	0
MDS-26	9	15	1	0
MDS-25	2	1	0	0

^aEgy reprezentatív kísérlet eredménye (n=3).



27. ábra. Egér csontvelői magvas sejtek galektin-1 kötésének áramlási citometriás vizsgálata. (A) Nem szeparált; illetve (B) Lin⁻ sejtekhez rekombináns Gal-1-et adtunk 100 mM laktóz egyidejű jelenlétében, vagy hiányában. A sejtekhez kötődött lektint indirekt úton, nyúl anti-galektin-1 F(ab)₂ és FITC-el jelzett kecske anti-nyúl IgG ellenanyagok segítségével mutattuk ki. Háromból egy reprezentatív kísérlet eredménye.



28. ábra. Galektin-1 hatása az egér csontvelői magvas sejtek CAFC kolóniaképzésére. 96-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon létrehozott konfluens stroma rétegre frissen szeparált csontvelői magvas sejtek különböző – előkísérletekben meghatározott - hígításait pipettáztuk, majd 33°C-os CO₂-termosztátban inkubáltuk a tálcákat. A stroma réteg alatt CAFC médiumban, illetve a tenyésztőfolyadék és 20 ng/ml Gal-1 egyidejű jelenlétében növekedő „macskakő” kolóniákat nem tartalmazó lyukakat minden héten inverz mikroszkópban leszámoltuk. A 7., 21. és 35. napi CAFC gyakoriságokat és a szignifikancia értékeket az L-Calcszoftver segítségével számítottuk ki. Háromból egy reprezentatív kísérlet eredménye.

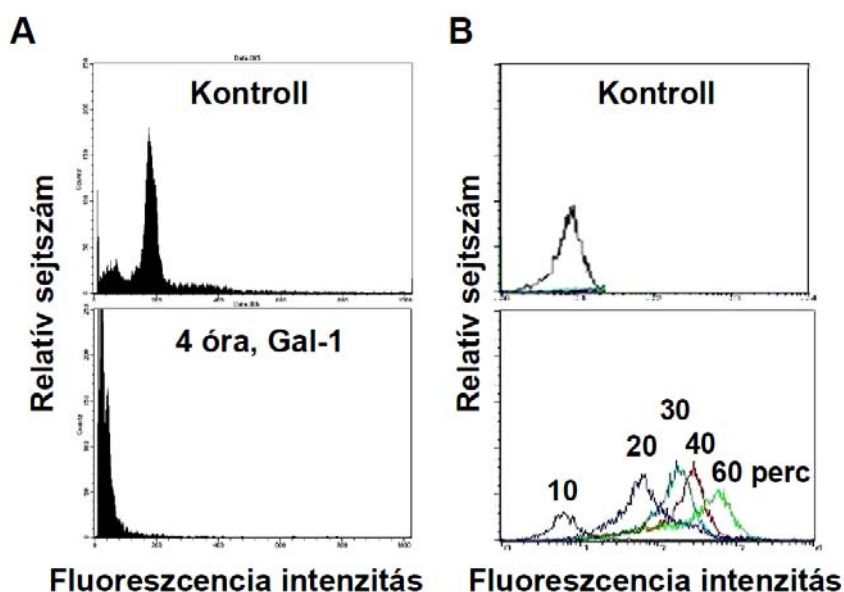
14. táblázat. Egér csontvelői mononukleáris sejtek kolóniaképzése rekombináns galektin-1 jelenlétében^a

Galektin-1 koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	Kolóniaszám / 10^5 csontvelői magvas sejt	
	<i>CFU-GM</i>	<i>BFU-E</i>
-	$142,5 \pm 3,5$	$61,5 \pm 6,4$
0,001	$157,5 \pm 10,6^*$	$55,5 \pm 5,4$
0,01	$230,0 \pm 7,1^*$	$85,5 \pm 6,4^*$
0,1	$160,0 \pm 7,1^*$	$82,5 \pm 6,4^*$
1,0	$117,5 \pm 10,6$	$72,0 \pm 4,2$
10,0	0,0	0,0

^aHárom kísérlet átlaga $\pm$ szórás.

* $p < 0,05$.

Ezt követően a csontvelői magvas sejteket különböző ideig inkubáltuk 37°C-on, 10 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 jelenlétében, majd propídium jodiddal (PI), vagy FITC-annexin-V-tel jelöltük őket. Mint a 29A. ábra mutatja, a nagy mennyiségű lektinnel végzett 4 órás kezelést követően a PI-dal jelölt mintákban a sejtek döntő zöme átcsúszott a sub-G0/G1 zónába, vagyis DNS-ük fragmentálódott. Az annexin-V-tel jelölődő sejtek arányának gyors növekedése a mintákban szintén megerősíti (29B. ábra), hogy a Gal-1 magas koncentrációban nem csak gátolja a vérképző sejtek osztódását, hanem apoptózisra is kényszeríti őket. A különböző korú (azaz különböző érettségű) vérképző sejtek azonban nem egyformán érzékenyek a Gal-1-indukált apoptózisra. Ha az egér csontvelői magvas sejteket, illetve Lin⁻ frakciójukat csak előinkubáltuk Gal-1-gyel (5 és 10 $\mu\text{g/ml}$) és ezután szélesztettük őket preformált stroma rétegre, a legnagyobb CAFC frekvencia csökkenést a 7 nap után számolt kolóniáknál tapasztaltuk. A fiatalabb sejtek (14 < 21 < 28 < 35-napos CAFC) egyre inkább megtartották kolóniaképző képességüket magas koncentrációjú Gal-1-gyel végzett előkezelés után is (15. táblázat). Minél fiatalabb tehát egy vérképző sejt, annál ellenállóbb a lektin-indukált apoptózissal szemben.



29. ábra. **A csontvelői magvas sejtek galektin-1-indukált apoptózisa.** (A) a 4 órán keresztül 10 $\mu\text{g/ml}$ Gal-1 jelenlétében inkubált sejtek jelölése propídium jodiddal a DNS állomány szinte teljes fragmentációját mutatja; (B) a sejtek FITC-annexin-V kötése 10, 20, 30, 40, illetve 60 perccel a lektin kezelés megkezdése után szintén erőteljes apoptózisra utal. Háromból egy reprezentatív kísérlet eredménye.

15. táblázat. **A legfiatalabb (35 napos CAFC kolóniát képző sejtek) a legkevésbé érzékenyek a galektin-1 indukált apoptózisra^a**

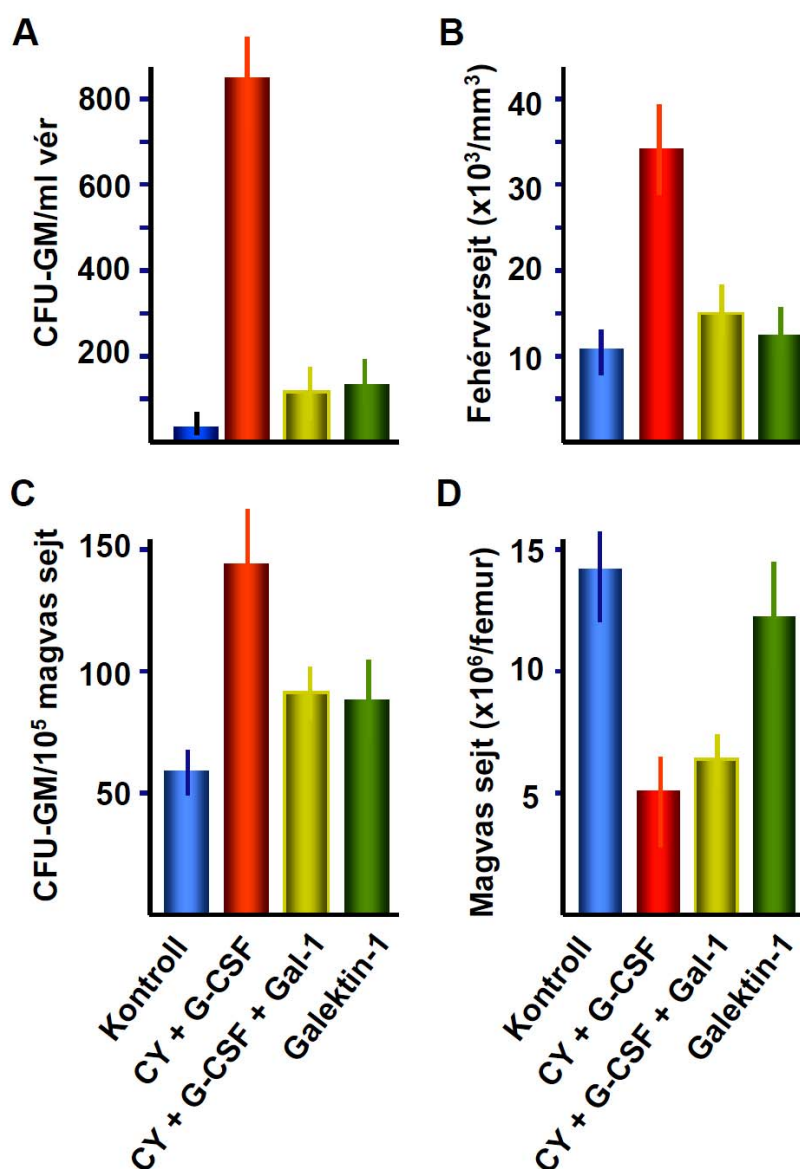
Sejt	Idő (nap)	CAFC gyakoriság		
		Médium	Galektin-1 koncentráció ($\mu\text{g/ml}$)	
			5	10
Csonvelői magvas sejtek	7	1:425	$< 1:10^6$	NT
	14	1:1655	$< 1:10^6$	NT
	21	1:9548	1:951 566	NT
	28	1:32 252	1:695 200	NT
	35	1:125 450	1:765 351	NT
Lin ⁻ sejtek	28	1:332	1:6966	15 642
	35	1:496	1:3158	9951

^aEgy reprezentatív kísérlet eredménye (n=3).

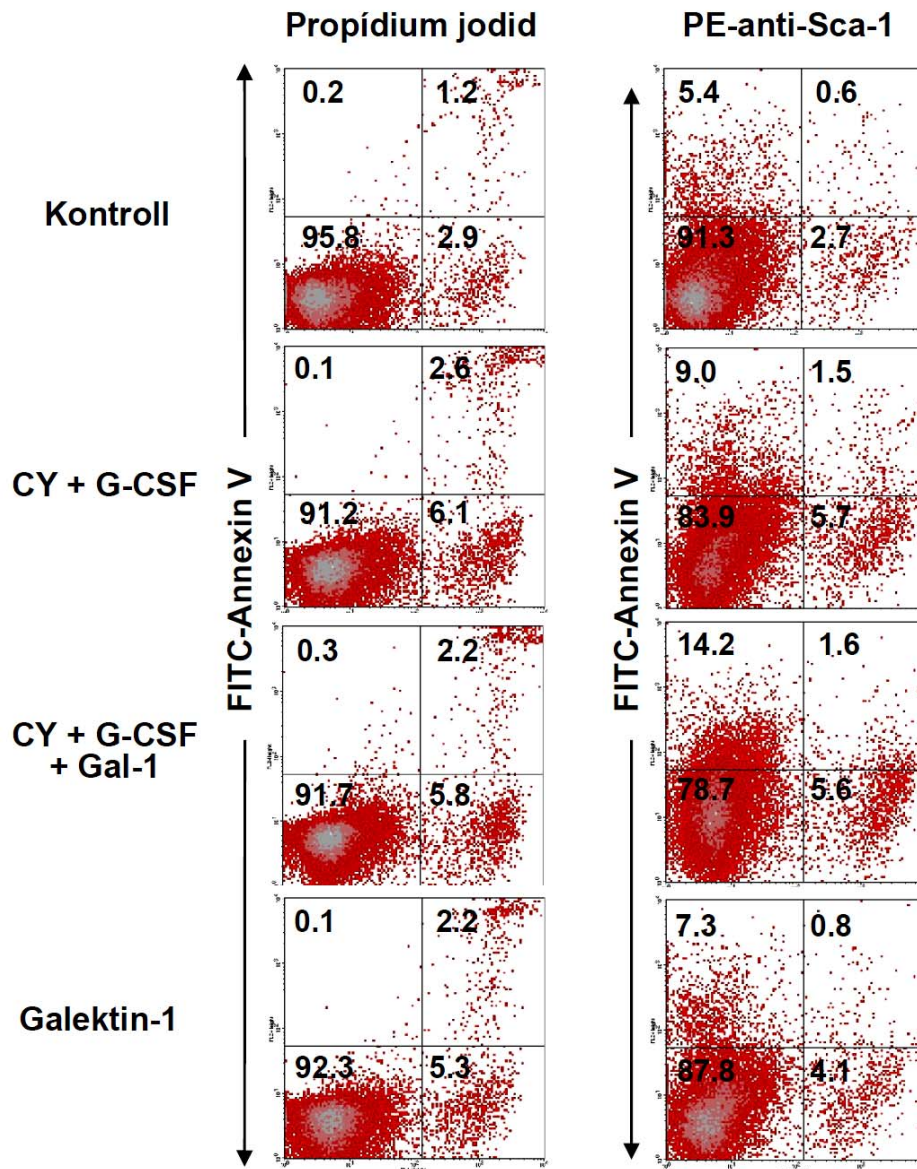
A Gal-1-nek a vérképző ős- és elődsejtek mobilizációjára gyakorolt hatását C57Bl/6 egerekben vizsgáltuk. A mobilizációt a klinikumban is alkalmazott ciklofoszfamid (Cy) – rekombináns granulocita kolónia-stimuláló faktor (G-CSF) kezeléssel indukáltuk. A lektint a Cy-al és a G-CSF-el párhuzamosan, subcutan adtuk az állatoknak (250 µg/testsúly kg/nap). Először a fehérvérsejt számot és a CFU-GM gyakoriságot határoztuk meg a kísérleti állatok vér- és csontvelő mintáiban. Mint a 30. ábra mutatja, a mobilizáció hatására öt nap alatt a fehérvérsejt szám mintegy 3-szorosára, a CFU-GM gyakoriság pedig 40-szeresére nőtt az állatok keringésében. A Gal-1 és a Cy/G-CSF együttes alkalmazása nagymértékben csökkentette az elődsejtek migrációját a csontvelőből a perifériára, a gátlás azonban nem volt teljes. (Ez valószínűleg azzal (is) magyarázható, hogy a lektin önmagában kis, de szignifikáns mértékű fehérvérsejt-mobilizációt okozott). A csontvelőben ugyanakkor a CFU-GM gyakoriság több mint 2-szeresére emelkedett a Cy/G-CSF kezelés hatására, melyet a Gal-1 egyidejű adása jórészt meggátolt. Az összes magvas sejtek száma viszont a mobilizációt követően csökkent a csontvelőben, és a Gal-1 ezt a változást nem befolyásolta. Kétségtelen, hogy a CFU-GM gyakoriság csökkent a csontvelőben, amikor a Cy-dal és G-CSF-fel egyidejűleg Gal-1-et is adtunk, azonban - ha a magvas sejtek számának egyidejű változását is figyelembe vesszük - az elkötelezett elődsejtek abszolút száma valójában nem változott szignifikánsan egy-egy combcsontban. A csontvelői sejtek mobilizációjának gátlása tehát valószínűleg nem a Gal-1 toxikus hatásának következménye. Ezt igazolandó, PI vs. FITC-annexin-V, illetve PE-anti-Sca1 ellenanyag vs. FITC-annexin-V festés segítségével is megvizsgáltuk a pusztuló sejtek arányát a csontvelői magvas sejt, valamint a csontvelői Sca-1⁺ sejtpopulációban. Mint a 31. ábra mutatja, a Gal-1 – legalábbis az *in vivo* kísérletek során alkalmazott mennyiségben - valóban nem indukál sem apoptózist, sem nekrozist ezekben a sejtekben.

A keringő fehérvérsejtek számának a mobilizáció során bekövetkező emelkedését a vérkép jelentős változása (is) kíséri (15. táblázat). A granulocyták és monocyták aránya megnőtt (22% vs. 33%, ill. 1% vs. 19%), a lymphocytáké viszont csökkent (78% vs. 48%) a Cy-dal és G-CSF-fel kezelt állatok vérében a csak fiziológiás sóoldattal oltott kontroll egerekéhez képest. A mobilizáció tehát főleg a csontvelői granulocyta/monocyta populációt érintette, azaz perifériás granulofiliát és monocytózist okozott. A Gal-1 meggátolta a granulofilia, és részben csökkentette a monocytosis kialakulását. Közben a csontvelőben a fiatal (Sca-1⁺) és a granulocyta/macrophag irányba elkötelezett (Gr-1⁺ és CD11b⁺) elődsejtek száma emelkedett szignifikánsan a mobilizáció 5. napjára, ami intenzív csontvelői regenerációra utal. Ha a Cy-dal és G-CSF-fel együtt Gal-1 is adtunk az

állatoknak, akkor az Sca-1⁺, Gr-1⁺, és CD11b⁺ sejtek aránya tovább emelkedett a csontvelőben. A CD3⁺ T lymphocyták aránya nem változott, a B-sejt fejlődési vonalba tartozó (B220⁺) sejtek aránya viszont csökkent (28% vs. 6%) a mobilizált csontvelőben, és ezt a Gal-1 nem befolyásolta. A lektin mobilizációt gátló hatása tehát a fiatal vérképző sejteket, valamint a granulocytákat és monocytákat érinti.



30. ábra. A galektin-1 hatása a granulocyta-macrophag kolóniaképző sejtek mobilizációjára. A kontroll, a Cy-dal és G-CSF-fel, a Cy-dal, G-CSF-fel és Gal-1-gyel, illetve a csak Gal-1-gyel kezelt egerek vérében (A, B) és csontvelő mintáiban (C, D) meghatároztuk a fehérvérsejt számot (B), illetve a magvas sejtek számát (D), valamint a CFU-GM gyakoriságot (A, C). A lektin nagymértékben csökkentette a progenitor sejtek Cy és G-CSF indukálta migrációját a csontvelőből a perifériára. A Gal-1 önmagában kis, de szignifikáns mértékű mobilizációt okozott. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.



31. ábra. **A galektin-1 citotoxicitásának vizsgálata.** Az esetlegesen pusztuló sejtek arányát a különböző kísérleti csoportokból származó, nem szeparált (A), illetve Sca-1⁺ (B) sejtekből álló csontvelő mintákban propidium jodid (PI) és annexin-V jelölés segítségével vizsgáltuk. A lektin kezelés sem a csontvelői magvas sejteket, sem ezek Sca-1⁺ szubpopulációját nem károsította, fokozott apoptózisra vagy nekrozisra utaló jelet nem tapasztaltunk. Háromból egy reprezentatív kísérlet eredménye.

15. táblázat. A különböző fehérvérsejt populációk és szubpopulációk megoszlása a vérben és a csontvelőben^a

		Kísérleti csoportok			
		<i>Kontroll</i>	<i>CY + G-CSF</i>	<i>CY + G-CSF</i> <i>+ Gal-1</i>	<i>Gal-1</i>
Vérkép (% sejt)	<i>Lymphocyta</i>	76,7 ± 4,5	47,6 ± 5,3*	65,4 ± 5,9*	79,8 ± 5,7
	<i>Granulocyta</i>	22,1 ± 1,3	33,1 ± 4,3*	23,2 ± 1,3	19,1 ± 1,8
	<i>Monocyta</i>	1,2 ± 0,2	19,3 ± 1,5*	11,4 ± 1,4*	1,1 ± 0,1
Csontvelő (% pozitív sejt)	<i>Sca-1</i>	6,9 ± 0,5	11,7 ± 1,1*	30,8 ± 2,9*	5,5 ± 0,7
	<i>CD3</i>	1,8 ± 0,2	1,9 ± 0,2	1,6 ± 0,5	1,9 ± 0,3
	<i>B220</i>	27,6 ± 1,8	5,8 ± 0,6*	5,9 ± 0,4	19,9 ± 2,1*
	<i>Ter-119</i>	10,7 ± 0,8	16,2 ± 0,9*	15,1 ± 1,1*	9,6 ± 1,1
	<i>Gr-1</i>	51,1 ± 2,9	54,8 ± 3,7	73,9 ± 5,4*	52,7 ± 3,2
	<i>CD11b</i>	49,9 ± 4,4	55,1 ± 4,5*	70,1 ± 3,9*	51,6 ± 2,8

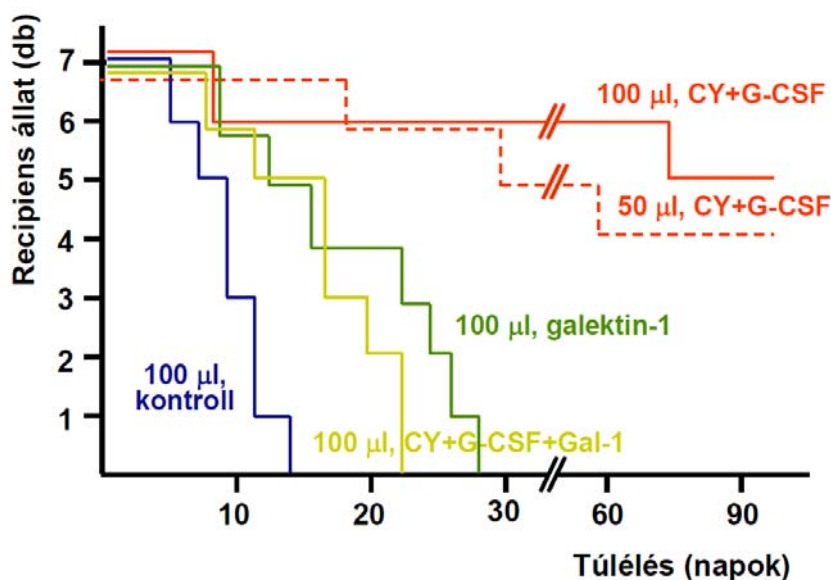
^aHárom kísérlet átlaga ± szórás.

* p < 0,05.

A mobilizált, fiatal (Sca-1⁺) sejtekből álló (szub)populáció LTRA potenciálú vértképző elemeket is tartalmaz. Ezt csontvelő transzplantációs kísérletekkel igazoltuk. Myeloablátalt (9 Gy egésztest besugárzás) recipiens állatokat kontroll, mobilizált, Cy-dal, G-CSF-fel és Gal-1-gyel oltott, valamint csak Gal-1-gyel kezelt egerek vérével transzplantáltunk. A recipiensek közül a 100, vagy 50 µl, Cy-dal és G-CSF-fel kezelt donor állatból származó vérrel történő transzplantációt 7 állatból 5, illetve 7-ből 4 élte túl tartósan (>90 nap). Ezzel szemben, ha a mobilizáció alatt Gal-1-gyel is kezelt egerek vérével transzplantáltunk, akkor az összes állat elpusztult a besugárzást követő 5-22. napon belül. Azok közül a recipiensek közül, amelyeket kezeletlen kontroll állatok vérével oltottunk, egy sem élt 14 napnál tovább (csontvelő halál) (32. ábra). A Gal-1 tehát képes volt meggátolni a tartós repopulációra képes (LTRA) HSC-k Cy- és G-CSF-indukált mobilizációját is.

Maga a mobilizáció több lépésből álló folyamat. Közülük az egyik legfontosabb, amikor a leukocyta az érfal (ill. sinusoid) endothel sejtjei között átlépve kijut a keringésbe. „Trans-well” kísérleteink azt mutatták, hogy a Gal-1 sem a csontvelői magvas sejtek, sem pedig a CFU-GM sejtek stroma-eredetű faktor-1 (SDF-1, vagy CXCL12) indukált

kemotaxisát nem befolyásolja. Ha viszont a két kultúra kompartmentet elválasztó membránra előzetesen endothel sejtekből álló összefüggő réteget növesztünk, akkor a Gal-1 már dóziszfüggően gátolja ugyanezen sejtek SDF-1-indukált migrációját (33. ábra). A lektin tehát a vizsgált sejtek transz-endothelialis migrációját akadályozza, ami teljes összhangban van a Gal-1 mobilizációt és gyulladást gátló aktivitásával.



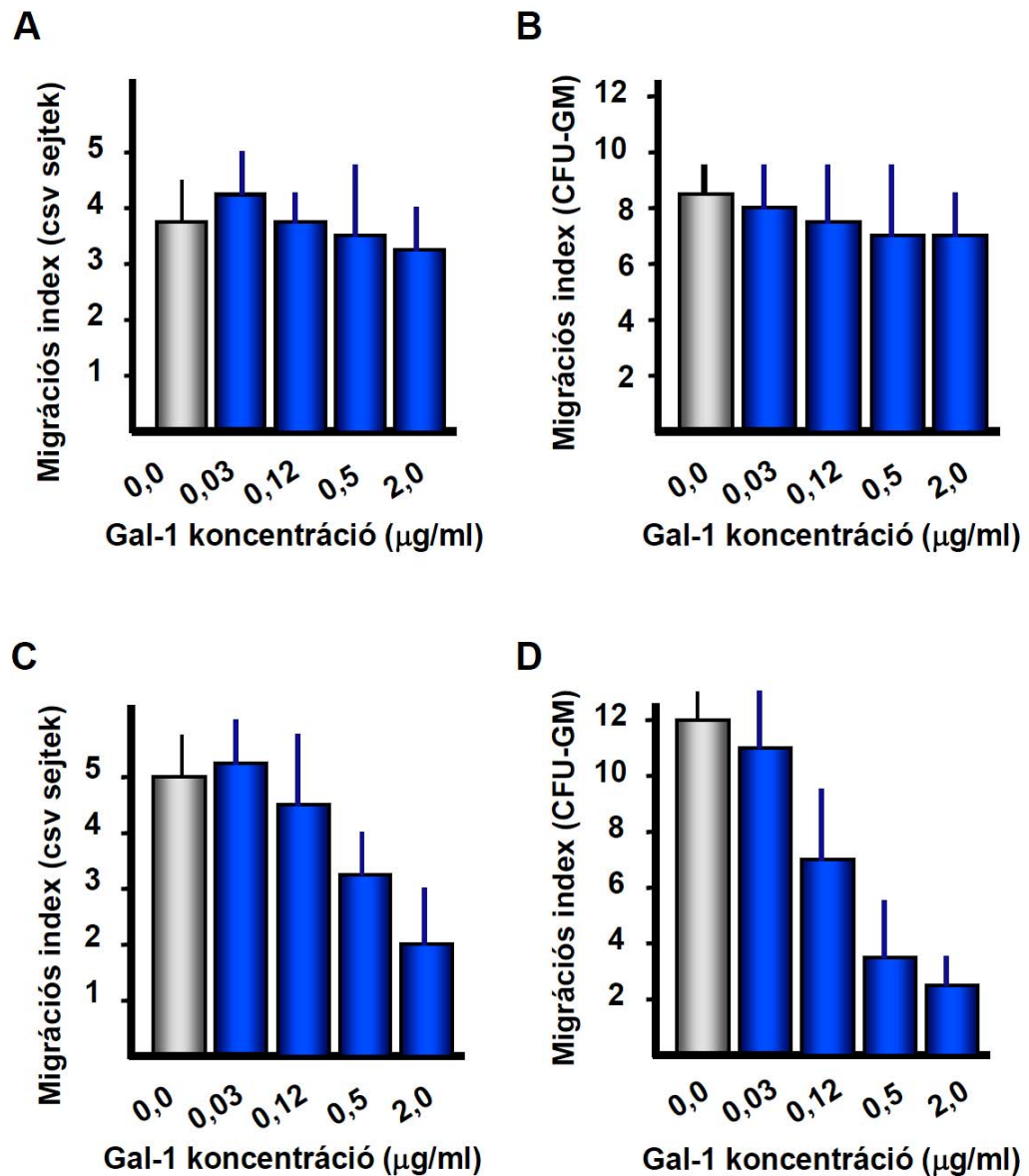
32. ábra. A galektin-1 hatása az *in vivo* tartós repopulációra képes vérképző őssejtek (LTRA-HSC) mobilizációjára. BDF1 egereket 900 cGy egésztest besugárzás után transzplantáltunk a különböző előkezelésen átesett, szingén donor állatoktól származó (50, vagy 100 µl) vérrel. Látható, hogy a myeloablatált egerek vérképzését csak a Cy-dal és G-CSF-fel mobilizált donorokból származó vér volt képes helyreállítani. A mobilizáció során Gal-1-gyel is kezelt egerek vére nem tartalmazott elegendő ős- és elődsejtet ahhoz, hogy tartósan helyreállítsa a recipiens állatok vérképzését, a Gal-1 tehát gátolta ezen sejtek mobilizációját.

4.4.2. Immunszuppresszió és gyulladás-gátlás

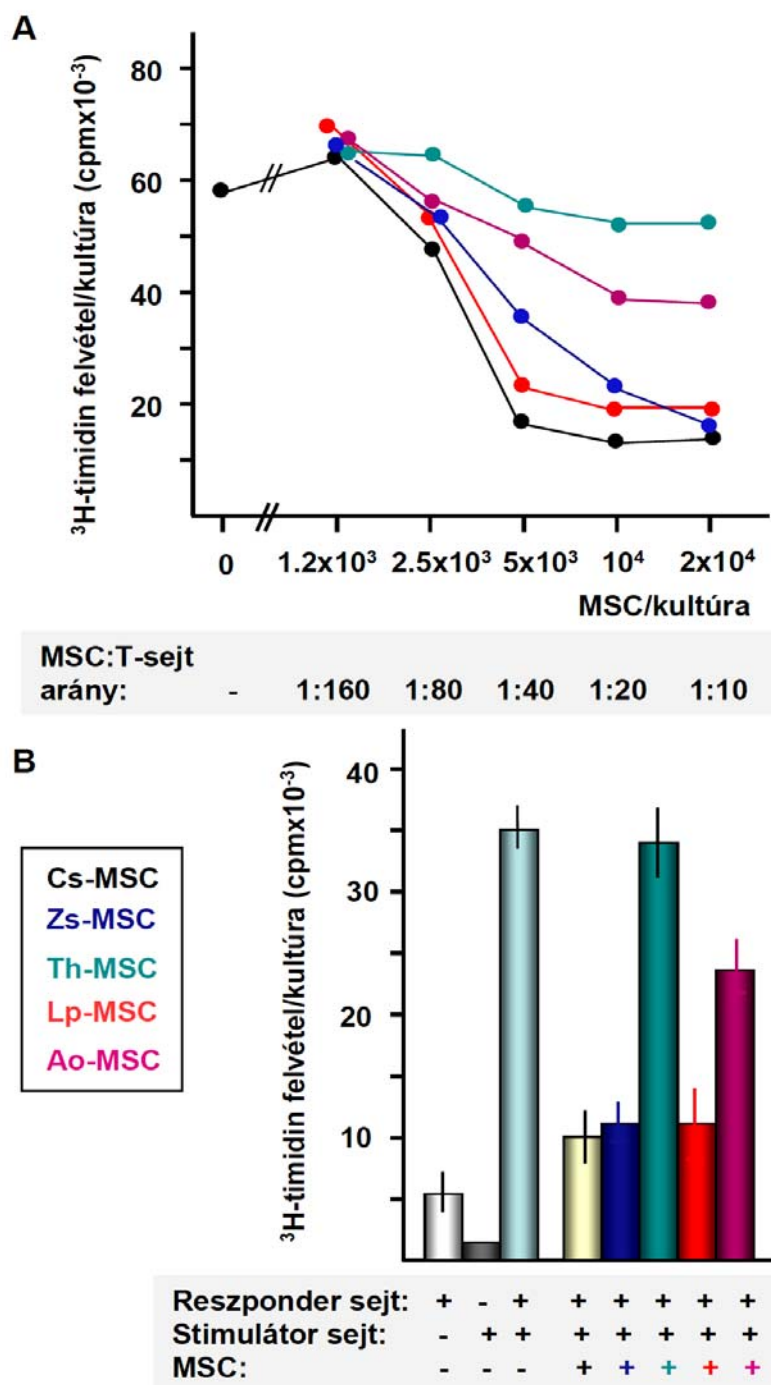
A mesenchymalis őssejtek egyik legmeglepőbb és terápiás szempontból legígéretesebb sajátása az *in vitro* kultúrákban és *in vivo* kísérleti rendszerekben is megnyilvánuló erőteljes immunszuppresszív és gyulladásgátló aktivitása Gebler A et al, 2012.

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

Első kérdésünk tehát az volt, hogy az általunk különböző szervekből izolált MSC-k rendelkeznek-e a csontvelői társaikéhoz hasonló, az aktivált T-sejtek osztódását gátló aktivitással. Mint a 34. ábra mutatja, a lépből és a zsírszövetből izolált MSC-k - a fiatal és a felnőtt állatok csontvelőjéből származó őssejtekhez hasonlóan – maximum 70-80%-os



33. ábra. A galektin-1 hatása a csontvelői magvas sejtek és a vérképző elődsejtek kemotaxisára és transzendotheliális migrációjára. A csontvelői sejteket az üres (A, B), illetve endothel sejtekkel fedett (C, D) Millicell- betétekbe helyeztük Gal-1 nélkül, vagy növekvő koncentrációjú Gal-1 hozzáadása mellett. A tálca lyukainak inzert alatti részébe 100 ng/ml rekombináns egér SDF-1-et tettünk (A-D), majd 6 órával később meghatároztuk a membránon keresztül a lyukak alsó részébe átvándorolt csontvelői magvas (A, C) és GM-CSF sejtek (B, D) számát. A migrációs index kiszámításához az SDF-1 hatására migráló sejtek számát elosztottuk a spontán vándorló sejtek számával. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.



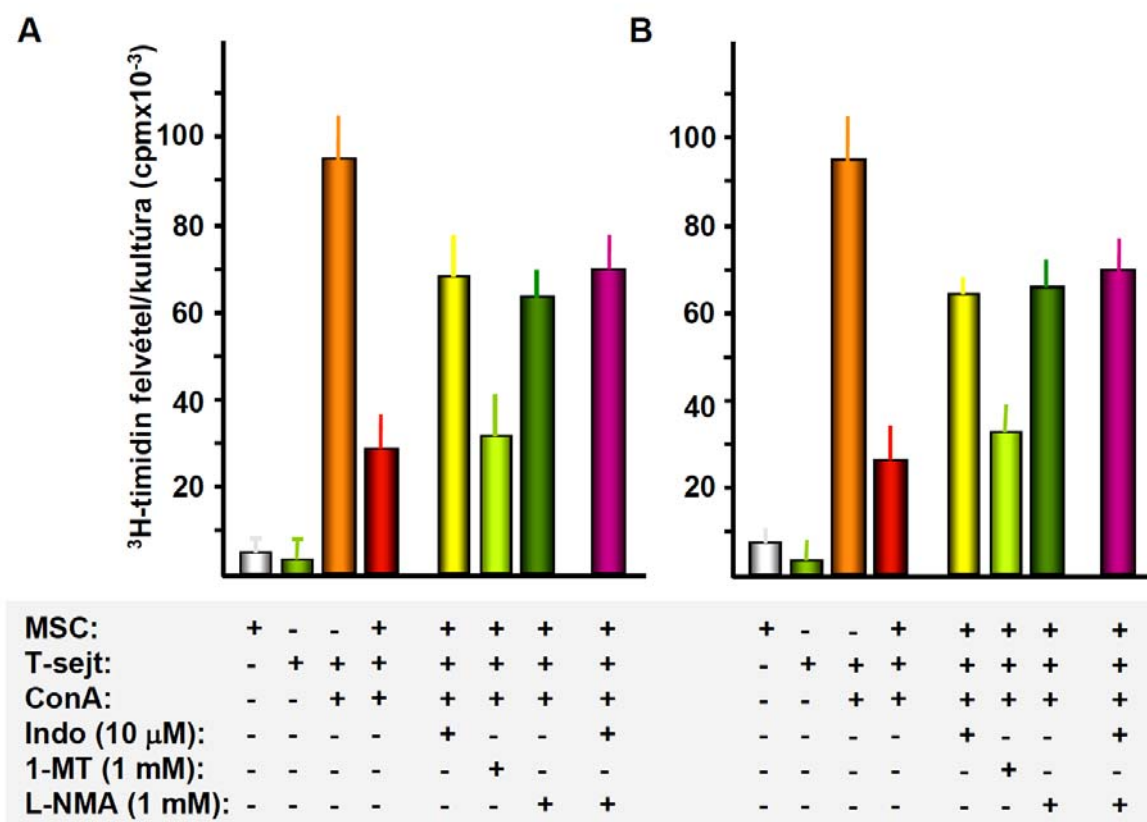
34. ábra. A különböző szervekből izolált mesenchymalis őssejtek hatása a lép T lymphocyták mitogén (ConA) és alloantigén indukált proliferációjára. (A) 96 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban az ábrán jelzett számú FCs-, Cs-, Zs-, Th-, Lp-, és Ao-MSC-eket 2×10^5 lép T-sejttel együtt inkubáltunk $5 \mu\text{g/ml}$ ConA jelenlétében. Két nap után $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -timidint adtunk a kultúrákhoz, majd további 8 óra elteltével learattuk a sejteket. (B) 96 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban 2×10^5 C57Bl/6 lépsejtet (responder sejtek) és 2×10^5 , besugárzott (30 Gy) Balb/c lépsejtet (stimulátor sejtek) inkubáltunk 10^4 , különböző eredetű MSC egyidejű jelenlétében. A tenyészeteket 4 nap elteltével jelöltük $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -timidinnel és további 8 óra múlva arattuk le a sejteket. A beütésszámokat (cpm) folyadékszintillátorban mértük. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.

mértékben gátolják a lépsejtek mitogén (ConA) indukált proliferációját. Az Ao-MSK-k kisebb (40-50%-os), de ugyancsak szignifikáns gátló aktivitással rendelkeznek, míg a Th-MSK-k nem befolyásolják a lép T-sejtek osztódását. Hasonló eredményt kaptunk, amikor a lép T-sejtek alloantigénre adott válaszában gátlását vizsgáltuk C57Bl/6 (H-2b) responder és besugárzott Balb/c (H-2d) stimulátor lépsejtekből összeállított kevert lymphocyták kultúrákban (MLR) a különböző eredetű MSK-k egyidejű jelenlétében.

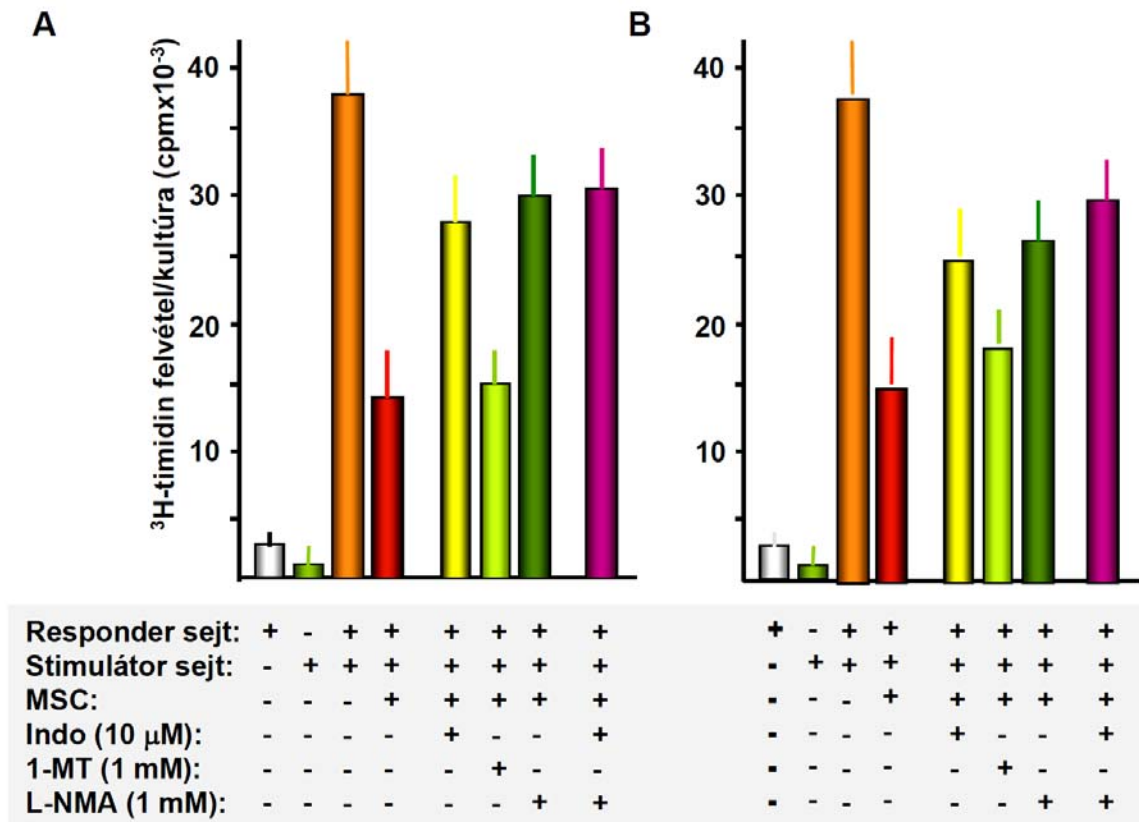
A szuppresszió mechanizmusát az MSK-kból felszabaduló – és az irodalmi adatok alapján szóba jöhető (Ben-Ami E et al, 2011) - különböző szolubilis mediátorok szintéziséért felelős enzimek aktivitásának gátlása alapján próbáltuk feltárni. ConA-val stimulált lép T-sejtekből és Cs-, vagy Zs-MSK-kból álló tenyészetekhez enzimgátlókat adtunk a lehető legmagasabb, sejtpusztulást még nem okozó koncentrációban. Megállapítottuk, hogy a ciklooxygenáz enzimeket (COX-1, COX-2) gátló indometacin (Indo, 10 μ M), valamint a nitrogén-oxid-szintáz (NOS) gátló N-metil-L-arginin-acetát (L-NMA, 1 mM) részben képes feloldani mind a Cs-, mind a Zs-MSK-k T-sejt osztódást gátló hatását. Az Indo és L-NMA együttes alkalmazása esetén azonban a két enzimgátló hatása nem volt additív. Az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO) működését gátló metil-triptofán (1-MT, 1 mM) adása egyáltalán nem befolyásolta az eredményeket (35. ábra). Mivel kevert lymphocyták kultúrában ugyanezt tapasztaltuk (36. ábra), elmondhatjuk, hogy a mitogén- és alloantigén-indukált T-sejt proliferáció MSK-k általi gátlásában a prosztaglandin(ok)nak és NO-nak is szerepe van, míg az IDO enzim nem érintett a folyamatban. Ugyanakkor tény, hogy „*trans-well*” kultúrákban, amikor a T-sejtek és MSK-k félig áteresztő hártyával vannak elválasztva egymástól, az össejtek nem képesek gátolni a T lymphocyták osztódását (nem mutatjuk). Ebből következik, hogy közvetlen sejt-sejt (MSK-aktivált T-sejt) kölcsönhatásra is szükség van a gátlás során.

4.4.2.2. A gyulladásos környezet szerepe a mesenchymalis össejtek prosztaglandin E2 termelésének szabályozásában

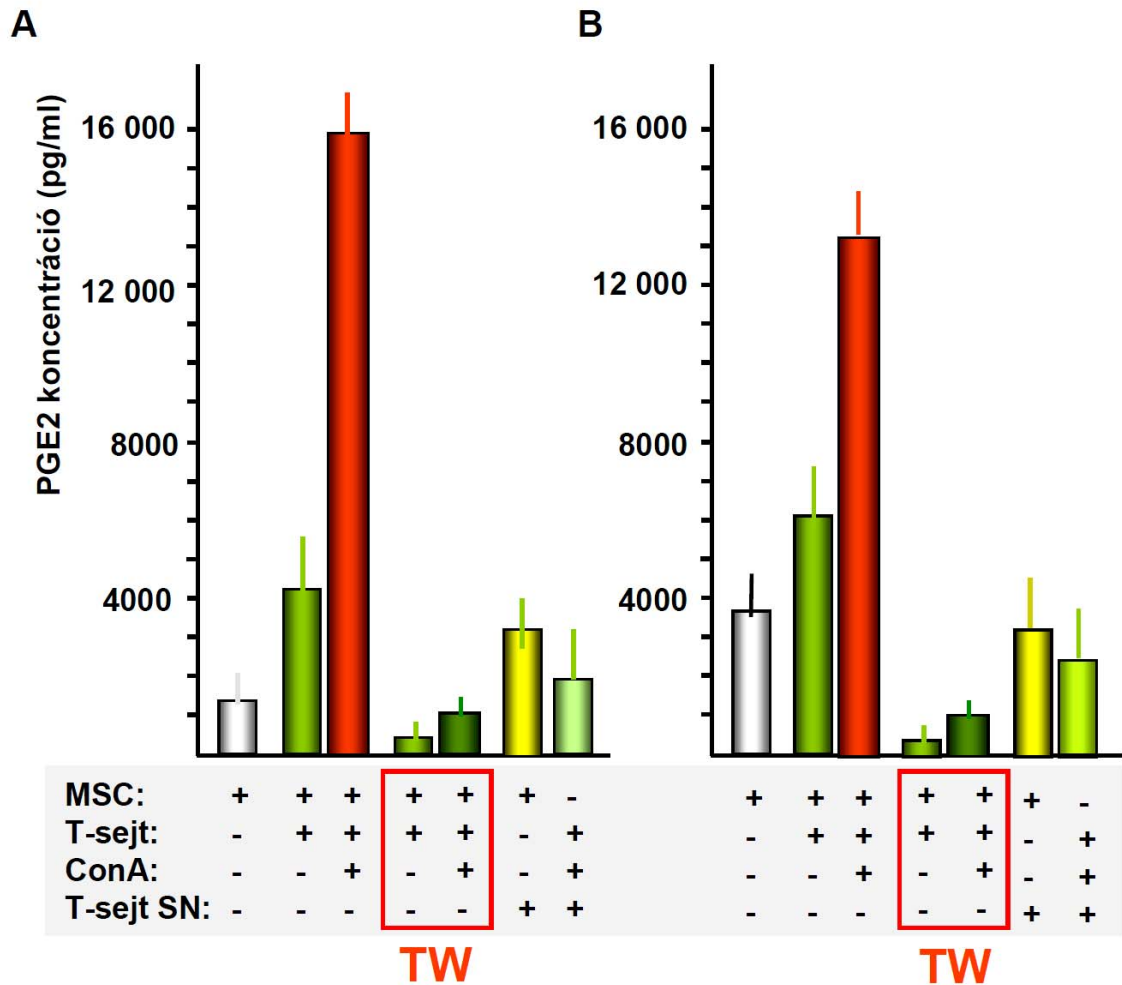
Részben a fenti eredmények, részben irodalmi adatok alapján (Németh K et al, 2009; De Miguel MP et al, 2012) a továbbiakban a Cs- és Zs-MSK-k prosztaglandin E2 (PGE2) termelésének szabályozására koncentráltunk. Amikor ConA-aktivált lép T-sejtekkel együtt tenyésztettük az MSK-keket, akkor mind a csontvelői, mind a zsírszövet eredetű össejtek PGE2 termelése megnőtt ($\sim 12-14 \times 10^3$ pg/ml) a kontroll - csak Cstv-, vagy csak Zs-MSK-keket tartalmazó - kultúrák felülszóiiban mérhető értékekhez (1857 ± 365 , ill. 3897 ± 415 pg/ml) képest (37A, B ábra).



35. ábra. A mesenchymalis őssejteknek a mitogén-indukált T lymphocytá proliferációra gyakorolt gátló hatása COX és NOS enzim gátlókkal részben feloldható. 96 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban - 2×10^5 lép T-sejtet, 2×10^4 csontvelői (A), illetve zsírszövet eredetű (B) MSC-t, 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA-t, valamint különböző enzimgátlókat (Indo, 1-MT, és L-NMA) inkubáltunk. Két nap elteltével 1 μCi ^3H -timidint adtunk a kultúrákhoz, majd további 8 óra múlva learattuk a sejteket. A beütésszámokat (cpm) folyadékszintillátorban mértük. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.



36. ábra. A mesenchymalis őssejteknek az alloantigén-indukált T lymphocita proliferációra gyakorolt gátló hatása COX és NOS enzimgátlókkal részben feloldható. 96 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban - 2×10^5 C57Bl/6 lépsejtet (responder sejtek), 2×10^5 besugárzott (30 Gy) Balb/c lépsejtet (stimulátor sejtek), 2×10^4 csontvelői (A), illetve zsírszövet eredetű (B) MSC-t, valamint különböző enzimgátlókat (Indo, 1-MT, és L-NMA) inkubáltunk. A tenyészeteket 4 nap elteltével jelöltük 1 μ Ci 3 H-timidinnel és további 8 óra múlva arattuk le a sejteket. A beütésszámokat (cpm) folyadékszintillátorban mértük. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.



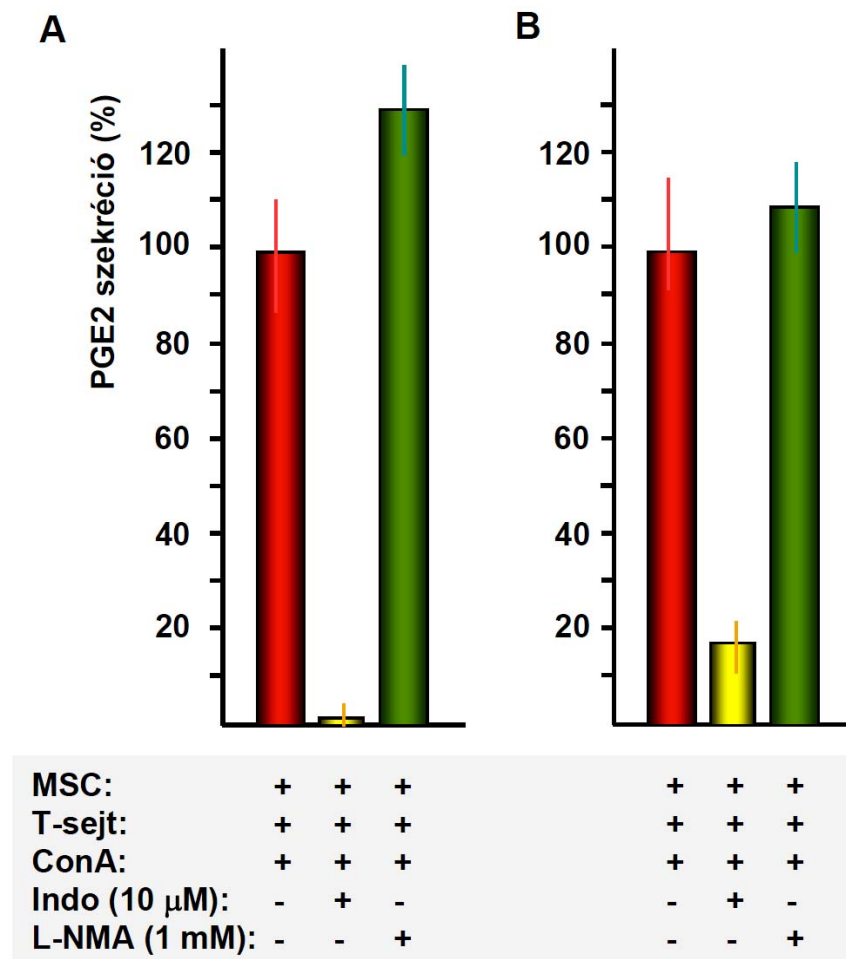
37. ábra. Az aktivált T lymphocyták erőteljesen fokozzák a mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2 termelését. 24 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban - 2×10^6 lép T-sejtet, 2×10^5 csontvelői (A), illetve zsírszövet eredetű (B) MSC-t, 5 $\mu\text{g/ml}$ ConA-t, valamint ConA aktivált T sejtek felülúszóját (T-sejt SN) inkubáltunk. Két nap után a tenyészetek felülúszóiban ELISA technikával meghatároztuk a PGE2 mennyiségét. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás. TW = „transwell” kultúra.

A nem aktivált T lymphocyták hatása hasonló, csak sokkal kisebb mértékű volt. Ha viszont fizikailag elválasztottuk egymástól a T-sejteket és az MSC-ket, vagy az intakt T lymphocyták helyett a ConA-aktivált T-sejtek felülszóját adtuk az MSC kultúrákhoz, az őssejtek PGE2 szekréciója soha nem haladta meg a kontroll értékeket. Az aktivált T-sejt indukált PGE2 termelés Indo jelenlétében gyakorlatilag megszűnt, az L-NMA azonban – ebben a kísérleti rendszerben - nem befolyásolta a mediátor termelését (38. ábra).

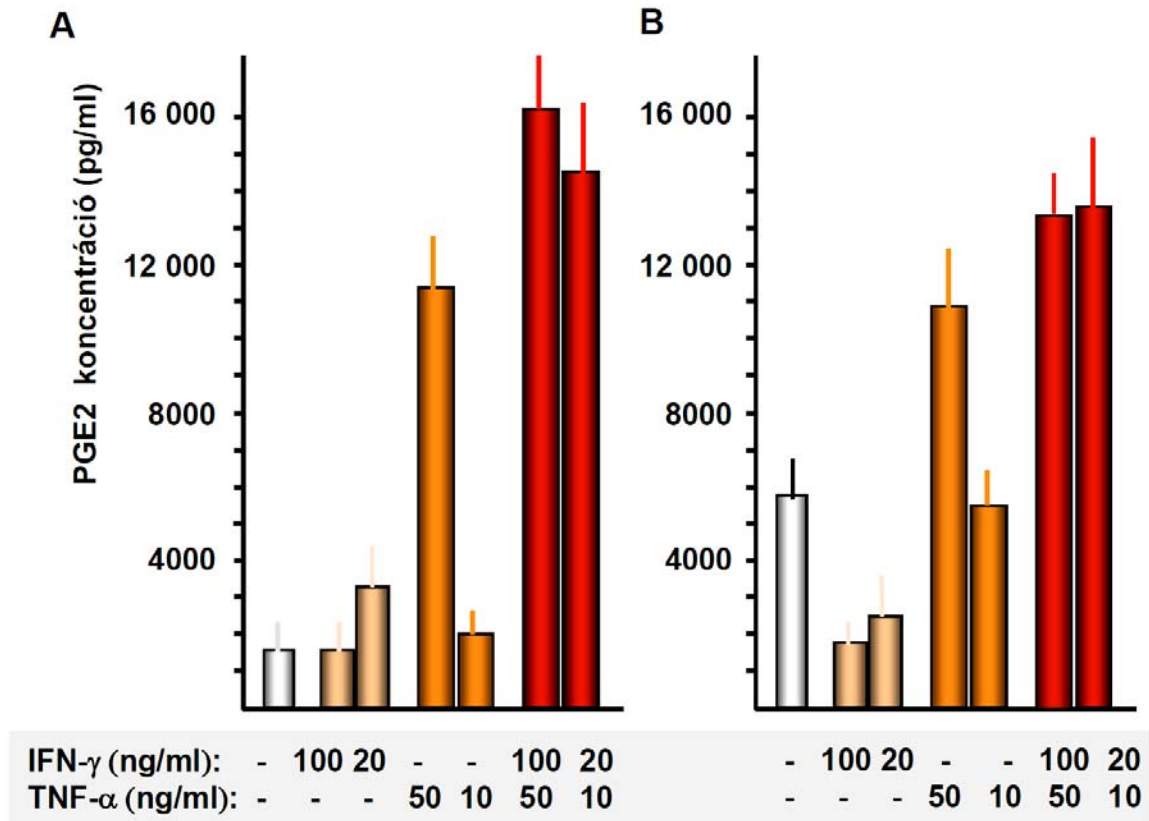
Némiképp eltérő eredményeket kaptunk, amikor az MSC-ket gyulladásokeltő citokinekkal kezeltük. A TNF- α magas (50 ng/ml) koncentrációban jelentős PGE2 szekréciót indukált az MSC tenyészetekben, de 10 ng/ml koncentrációban már hatástalannak bizonyult. Az IFN- γ viszont – önmagában - mindkét vizsgált koncentrációban (100 és 20 ng/ml) hatástalan volt. Ugyanakkor, ha a két citokint együtt alkalmaztuk, akkor alacsony koncentrációk (10 ng/ml TNF- α és 20 ng/ml IFN- γ) esetén is igen jelentős PGE2 termelést mértünk mind a Cs-, mind a Zs-MSK kultúrák felülszójában (39. ábra). A két citokinnek az MSC-k PGE2 termelésére gyakorolt hatása tehát erősen szinergisztikus. Ráadásul, a TNF- α és az IFN- γ egyidejű jelenlétében indukált PGE2 termelés az Indo mellett - legalábbis részlegesen (60-70%) – L-NMA-val is gátolható, míg a magas koncentrációjú (50 ng/ml) TNF- α -val kiváltott PGE2 termelés nem (40. ábra). A NO, pontosabban a nitrit koncentrációja ugyanezekben az MSC felülszókban legfeljebb 2-3-szorosára nőtt a kezeletlen kontrollhoz ($8,1 \pm 4,2 \mu\text{M}$) képest, függetlenül attól, hogy milyen citokin koncentrációt, illetve kombinációt alkalmaztunk (nem mutatjuk). Feltételezzük tehát, hogy a NO-nak elsősorban az MSC-ken belüli jeltovábbításban lehet szerepe a PGE2 termelés szabályozása során.

4.4.2.3. A mesenchymalis őssejtek és a mononukleáris fagocitasejtek kölcsönhatása – a macrophagok polarizációjának változása az őssejtek jelenlétében

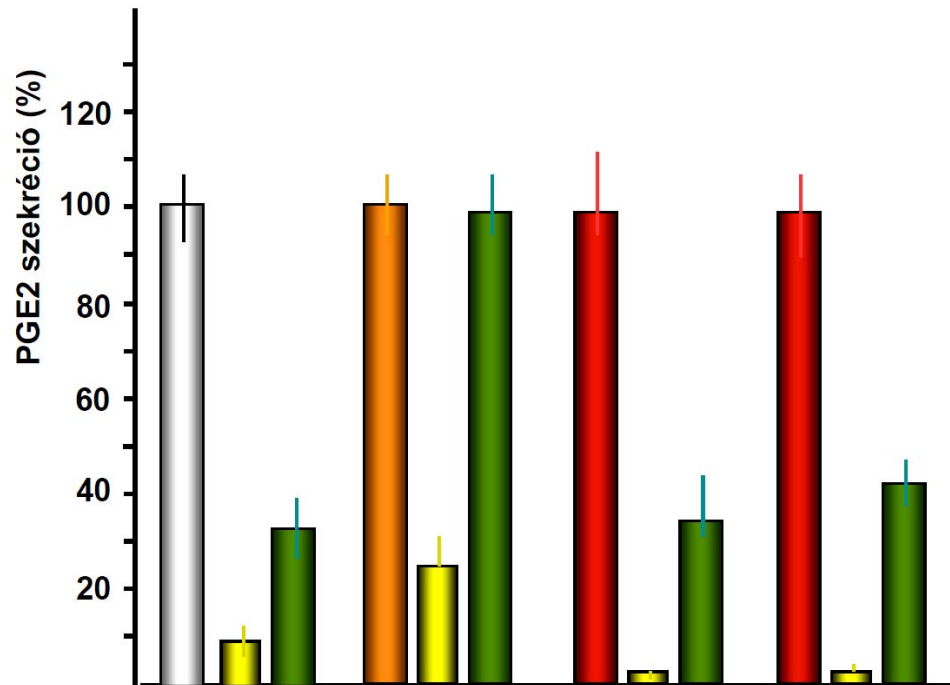
Az MSC-k PGE2 termelésének vizsgálata azért (is) fontos, mert – mint erre irodalmi adatok is utalnak (Németh K et al, 2009) - ez lehet az őssejtek és a mononukleáris fagocitasejtek közötti kölcsönhatás(ok) során felszabaduló egyik legfontosabb szolubilis mediátor. A laboratóriumunkban az értekezés megírásakor folyó kísérletek még nem publikált eredményei arra utalnak, hogy az MSC-k képesek befolyásolni a szöveti macrophagok (M Φ) polarizációját. Mind a Cs-MSK-k, mind a Zs-MSK-k képesek fokozni például a peritoneális M Φ -ok fagocitáló képességét és egyidejűleg jelentősen megváltoztatni a fagocita sejtek által szekretált citokinek arányát a kultúra-felülszókban. Bár a TNF- α abszolút mennyiségét általában nem befolyásolják, a gyulladásgátló hatású



38. ábra. **A mesenchymalis őssejtek T-sejt indukált prosztaglandin E2 termelése indometacinnal gátolható.** 24 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban - 2×10^6 lép T-sejtet, 2×10^5 csontvelői (A), illetve zsírszövet eredetű (B) MSC-t, 5 μ g/ml ConA-t, valamint COX és NOS enzimgátlókat (Indo, ill. L-NMA) inkubáltunk. Két nap után a tenyészetek felülúszóiban ELISA technikával meghatároztuk a PGE2 mennyiségét. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.

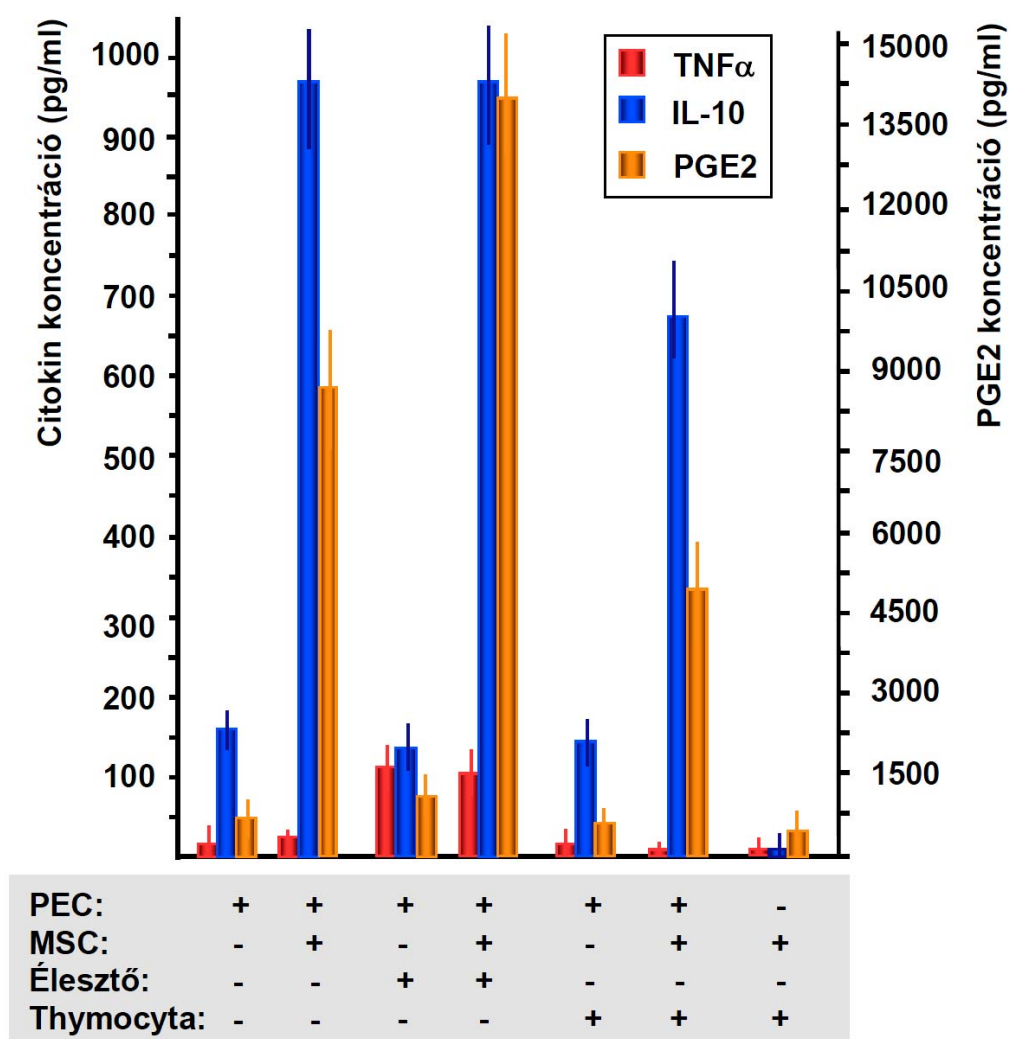


39. ábra. A mesenchymalis őssejtek gyulladásos citokinek jelenlétében is nagy mennyiségű prosztaglandin E2-t termelhetnek. 24 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban - 2×10^5 csontvelői (A), illetve zsírszövet eredetű (B) MSC-t inkubáltunk rekombináns TNF- α és/vagy IFN- γ jelenlétében. Két nap után a tenyészetek felülúszóiban ELISA technikával meghatároztuk a PGE2 mennyiségét. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.



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

40. ábra. A mesenchymalis őssejtek gyulladásos citokin-indukált prosztaglandin E2 termelésének gátlása. 24 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban - 2×10^5 csontvelői eredetű MSC-t, különböző mennyiségű TNF- α -t és/vagy IFN- γ -t, valamint COX és NOS enzimgátlókat (Indo, ill. L-NMA) inkubáltunk. Két nap után a tenyészetek felülúszóiban ELISA technikával meghatároztuk a PGE2 mennyiségét. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.



41. ábra. A mesenchymalis őssejtek hatása a fagocitáló macrophagok citokin és prosztaglandin E2 termelésére. 24 lyukú tenyésztőtálcák lyukaiban - az ábrán feltüntetett kombinációkban – 2×10^5 peritoneális MΦ-ot, élesztő sejteket, apoptotizáló thymocytákat és csontvelői eredetű MSC-eket inkubáltunk. Két nap után a tenyészetek felülúszóiban ELISA technikával mértük a TNF- α , az IL-10 és a PGE2 koncentrációját. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás.

IL-10 szintjét – a felülűzők PGE2 koncentrációjának növekedésével többé-kevésbé párhuzamosan - erőteljesen fokozzák (41. ábra). Az LPS-el *in vitro* aktivált MΦ-ok M1 irányú polarizációját szintén gátolják a stroma sejtek. Ráadásul, olyan kísérleti elrendezésben, ahol MΦ-ok, MSC-k és *in vivo* aktivált, antigén-specifikus T-sejtek egyidejűleg vannak jelen, nő a regulátor T-sejtek és csökken a gyulladásos folyamatokban aktiváló szerepet játszó Th17 sejtek aránya (nem mutatjuk). Mindezek alapján MSC-k jelenlétében a MΦ-ok sokkal inkább gyulladásgátló (M2-es, pontosabban M2b vagy „regulátor”), semmint „klasszikus” gyulladáskeltő (M1-es) fenotípust mutatnak. Az MSC - MΦ kölcsönhatásnak tehát meghatározó szerepe lehet az őssejtek *in vivo* megfigyelhető erőteljes immunosuppresszív és gyulladásgátló aktivitásában, valamint a sérült szövetek regenerációjában is.

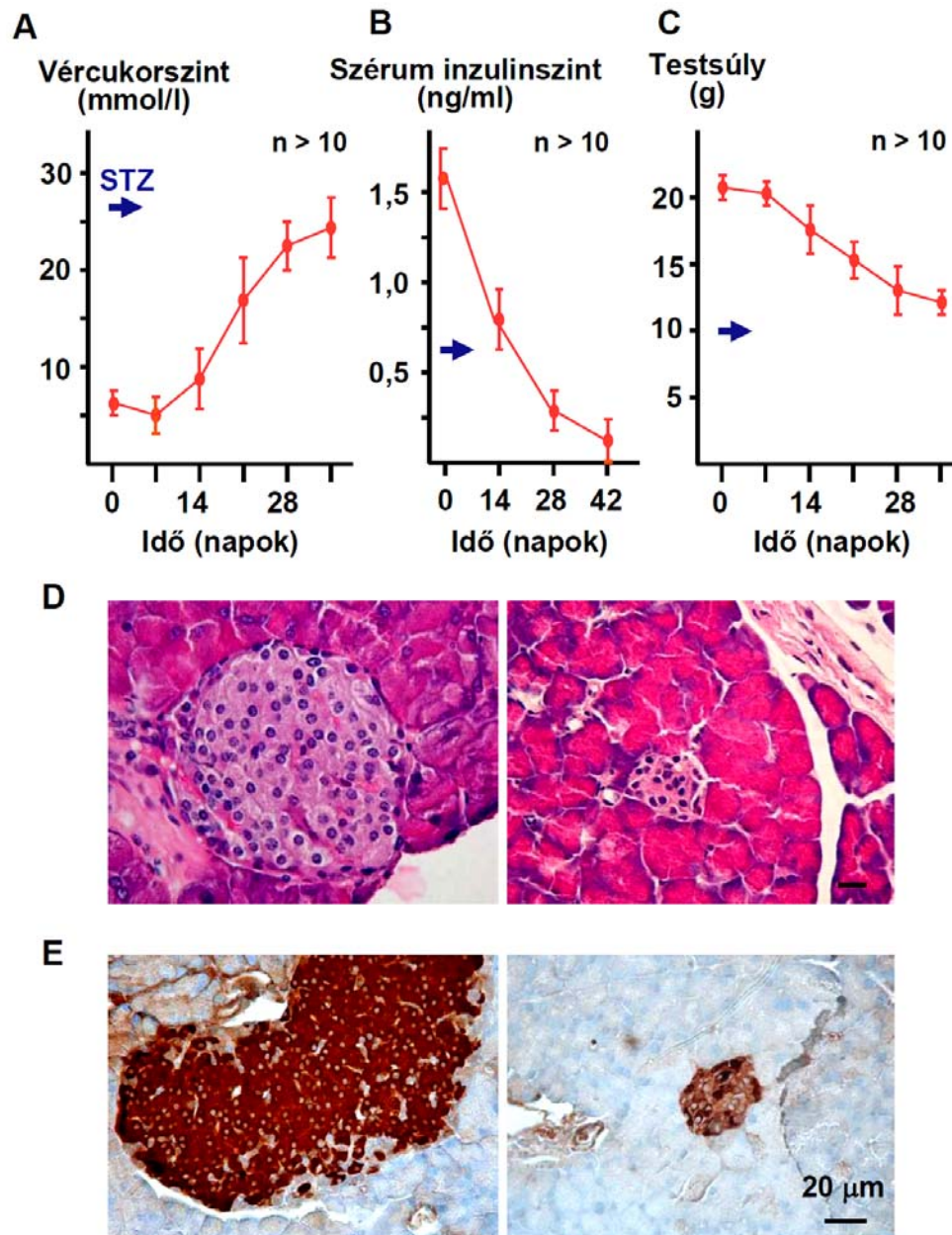
4.4.3. Szövet-regeneráció és sejtherápia - a streptozotocin-indukált diabetes őssejtherápiája

Az MSC-k esetleges terápiás felhasználásának előkészítésére különösen alkalmasak azok a preklinikai állatmodellek, amelyekben a betegség (például az 1-es típusú diabetes) gyógyítása valamely károsodott szövet regenerációján, és - egyidejűleg - az érintett sejteket károsító gyulladás, vagy autoimmun folyamat gátlásán alapul.

4.4.3.1. Az streptozotocin-indukált 1-es típusú diabetes friss csontvelősejtek és *in vitro* felszaporított mesenchymalis őssejtek egyidejű adásával gyógyítható

A diabetest kis mennyiségű – 50 mg/testsúly kg/nap – streptozotocin (STZ) ismételt intraperitoneális adásával idéztük elő felnőtt, C57Bl/6 nőtény egerekben. A betegség progresszióját a vércukorszint emelkedésének, valamint a szérum inzulinszint és a testsúly csökkenésének mérésével követtük nyomon. A β-sejtek pusztulását szövettani és immunhisztokémiai módszerekkel igazoltuk. A vércukorszint emelkedése a kezelés megkezdésétől számított 7. napon már mérhető volt, és a 35. napra elérte a $24,91 \pm 3,93$ mM értéket, azaz a kezeletlen kontroll állatok vércukorszintjének ($5,71 \pm 0,42$ mM) 4-5-szörösét (42A. ábra). Ezzel párhuzamosan csökkent a kísérleti állatok szérum inzulin szintje (42B. ábra) és testsúlya is (42C. ábra). A kísérletek 21. napján feláldozott állatok pancreasában, az egészséges kontroll egerekéhez képest jelentősen csökkent a Langerhans-szigetek mérete és a még megmaradt szigetsejtek is erősen károsodtak (42D. ábra). A β-sejtek tömeges pusztulását az inzulinra specifikus immunhisztokémiai jelölés is igazolta (42E.

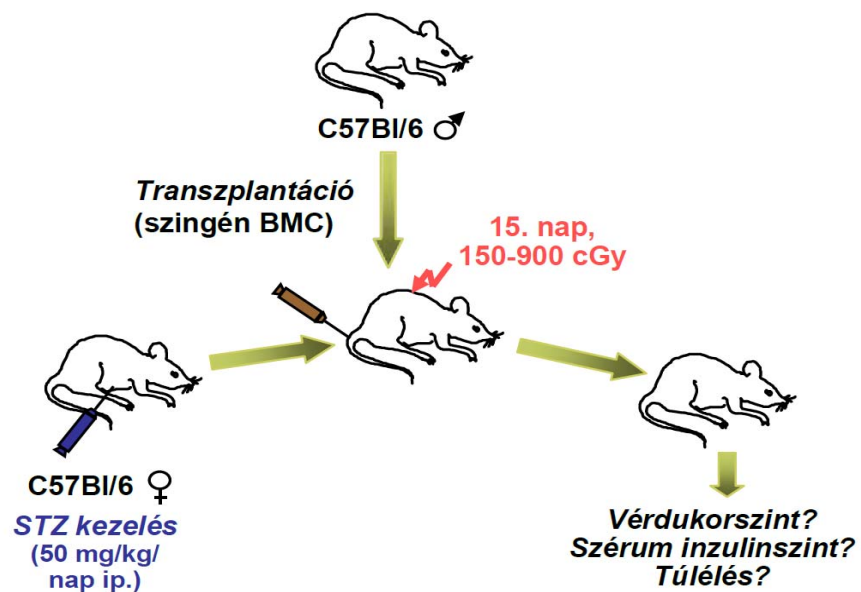
ábra). A beteg állatok - a szénhidrát-anyagcsere súlyos zavara következtében – 4-6 hét után elpusztultak.



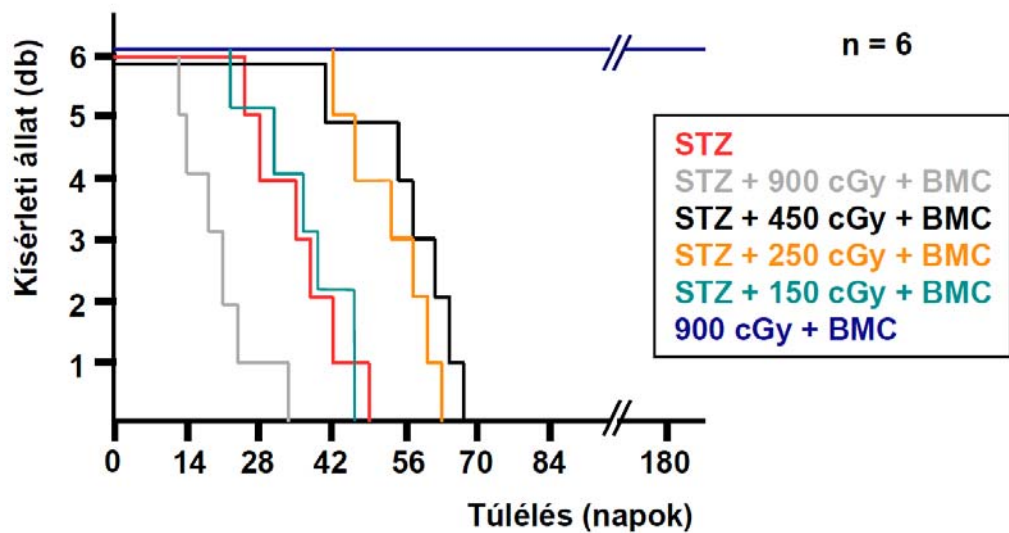
42. ábra. **A streptozotocin-indukált diabetes progressiója.** Az STZ kezelést követően az állatok vércukorszintje jelentősen megnőtt (A), aminek háttérében a szérum inzulinszintjének csökkenése (B) állt. Ezzel párhuzamosan a kísérleti állatok testsúlya (C) is jelentősen csökkent. A hematoxylin-eosin festéssel készült pancreas metszeteken (D) jól látszik a kontroll állat (bal oldali kép) és az STZ kezelésen átesett állat (jobb oldali kép) Langerhans-szigetei közötti markáns méret-, szerkezet-, és festődésbeli különbség. Az inzulintermelő sejtek pusztulását a – párhuzamos metszeteken - peroxidáz enzimmel jelölt anti-inzulin ellenanyaggal végzett immunhisztokémia vizsgálat mutatja (E).

Első kérdésünk az volt, hogy csontvelő transzplantációval lassítható-e az STZ-indukált diabetes progressziója, illetve gyógyítható-e a betegség. A transzplantációhoz szükséges egésztest besugárzást (TBI) és magát az átültetést az STZ kezelés megkezdése utáni 15. napon végeztük azokon az állatokon, amelyeknek a vércukorszintje két egymás utáni napon (14. és 15. nap) elérte, vagy meghaladta a 10 mM értéket. A TBI mértékét a teljes myeloablációt kiváltó 900 cGy-ről fokozatosan 450, 250, illetve 150 cGy-re csökkentettük a különböző kísérleti csoportokban. Az így előkészített állatok – a besugárzás után 4 órával – 10^6 , hím C57Bl/6 egerekből frissen szeparált csontvelői magvas sejtet (BMC) kaptak intravénásan (43. ábra). A maximális (900 cGy) dózissal besugárzott cukorbeteg állatok az azonnali csontvelő transzplantáció ellenére hamarosan elpusztultak, míg a kontroll – STZ-vel nem kezelt – egerek túléltek (>6 hónap) a beavatkozást (44. ábra). Az STZ és a 900 cGy dózisú TBI együttes toxikus hatását tehát csontvelő transzplantációval nem lehetett kivédeni. A legalacsonyabb TBI-t (150cGy) követő transzplantációnak sem a cukorbeteg állatok túlélésére (44. ábra), sem vércukorszintjük emelkedésére nem volt szignifikáns hatása (45. ábra). Ha viszont közepes (250 vagy 450 cGy) dózisú TBI után kaptak csontvelő *graftot* a beteg állatok, akkor vércukor szintjük emelkedése átmenetileg megállt, vagy lelassult, de 2-3 hét után újra gyors emelkedésnek indult és 8-10 hét elteltével valamennyi egér elpusztult. Ebben az esetben tehát a diabetes progressziója némiképp lelassult, de komoly terápiás hatást nem értünk el.

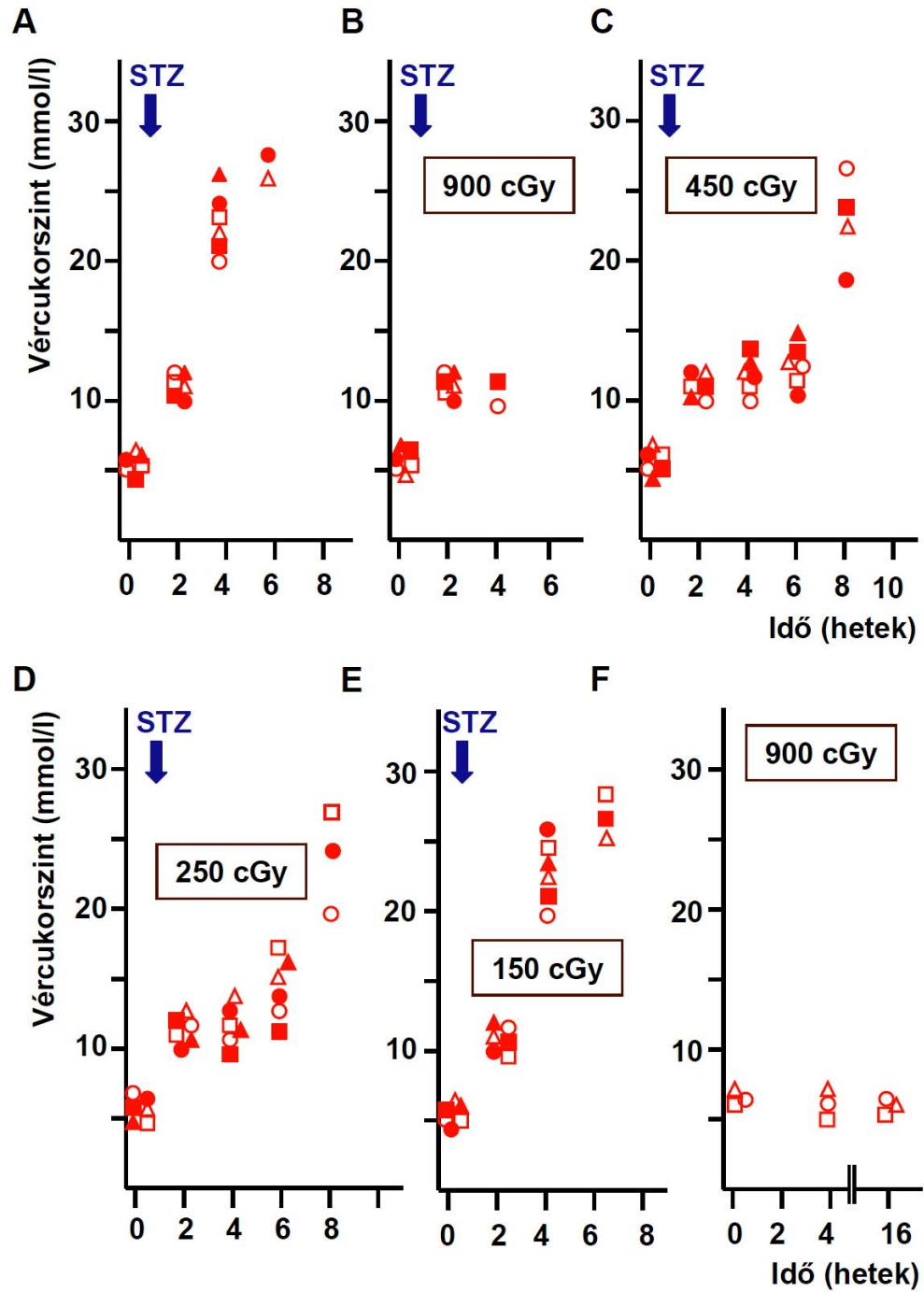
A következő lépésben a szubletális dózisú (250 cGy) besugárzás utáni csontvelő transzplantációt *in vitro* kultúrában felszaporított, szigén (C57Bl/6), szemiallogén ((C57Bl/6xDBA/2)F1), vagy allogén (CD1, ill. CD1-TgEGFP) hím donorból származó MSC-k egyidejű, intravénás adásával egészítettük ki (46. ábra). Ebben a kísérleti elrendezésben, 10^6 vagy 5×10^5 BMC, és 10^5 vagy 5×10^4 MSC együttes adása után a beteg állatok vércukor szintje hamar visszatért a normális kontroll szintre (47A-D ábra), szérum inzulin szintjük normalizálódott (48A-C ábra), és a beavatkozást követő 16. héten is életben voltak), gyógyulásuk tehát teljes és véglegesnek tekinthető. Ugyanakkor az MSC-k önmagukban – BMC-k nélkül adva – nem befolyásolták a betegség lefolyását és az STZ-vel kezelt állatok túlélését (47D és 48C ábra). A kettős transzplantáció hatékonyságát, illetve az így kezelt diabeteses állatok végleges gyógyulását a glükóz tolerancia teszt (49A ábra) és a hasnyálmirigy szigetek erőteljes (közel 70%-os) regenerációja (49B-D ábra) is igazolja. (Megjegyzendő, hogy inzulin pozitív sejteket sem a májban, sem a lépben, sem a tüdőben, vagy a csontvelőben nem tudtunk kimutatni a sikeres transzplantáció után).



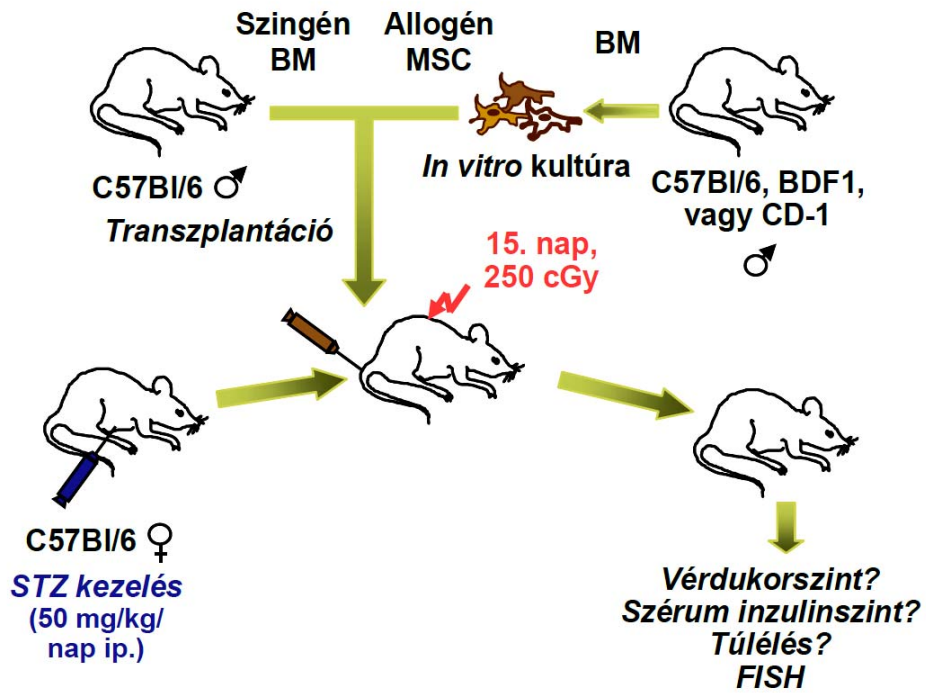
43. ábra. A cukorbeteg állatok kezelése hagyományos csontvelő transzplantációval különböző dózisú egésztest besugárzás után



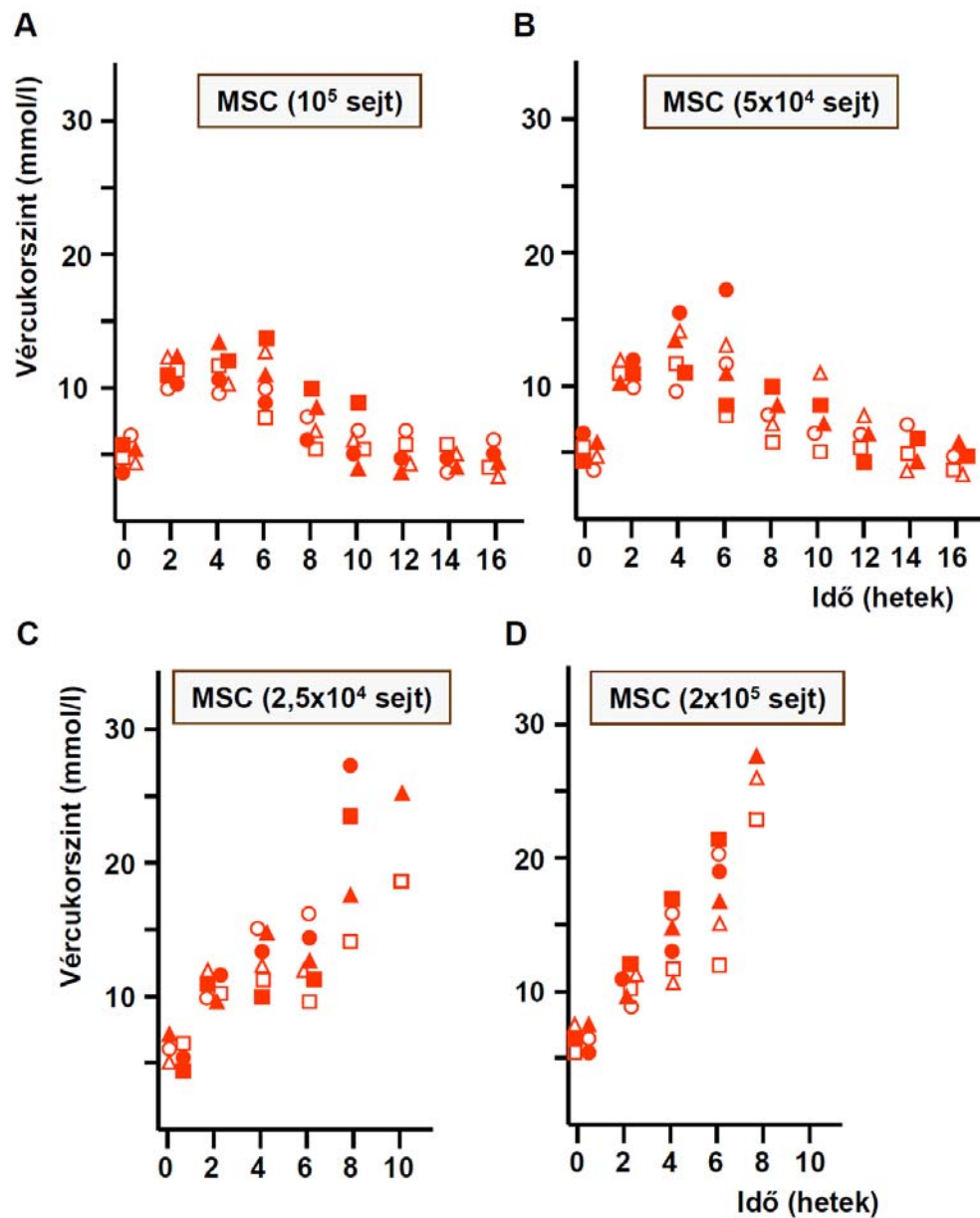
44. ábra. A streptozotocin-indukált cukorbetegség hagyományos csontvelő transzplantációval nem gyógyítható. Az eltérő mértékű (150-900 cGy) egésztest besugárzásnak kitett, majd transzplantált kísérleti állatok túlélése.



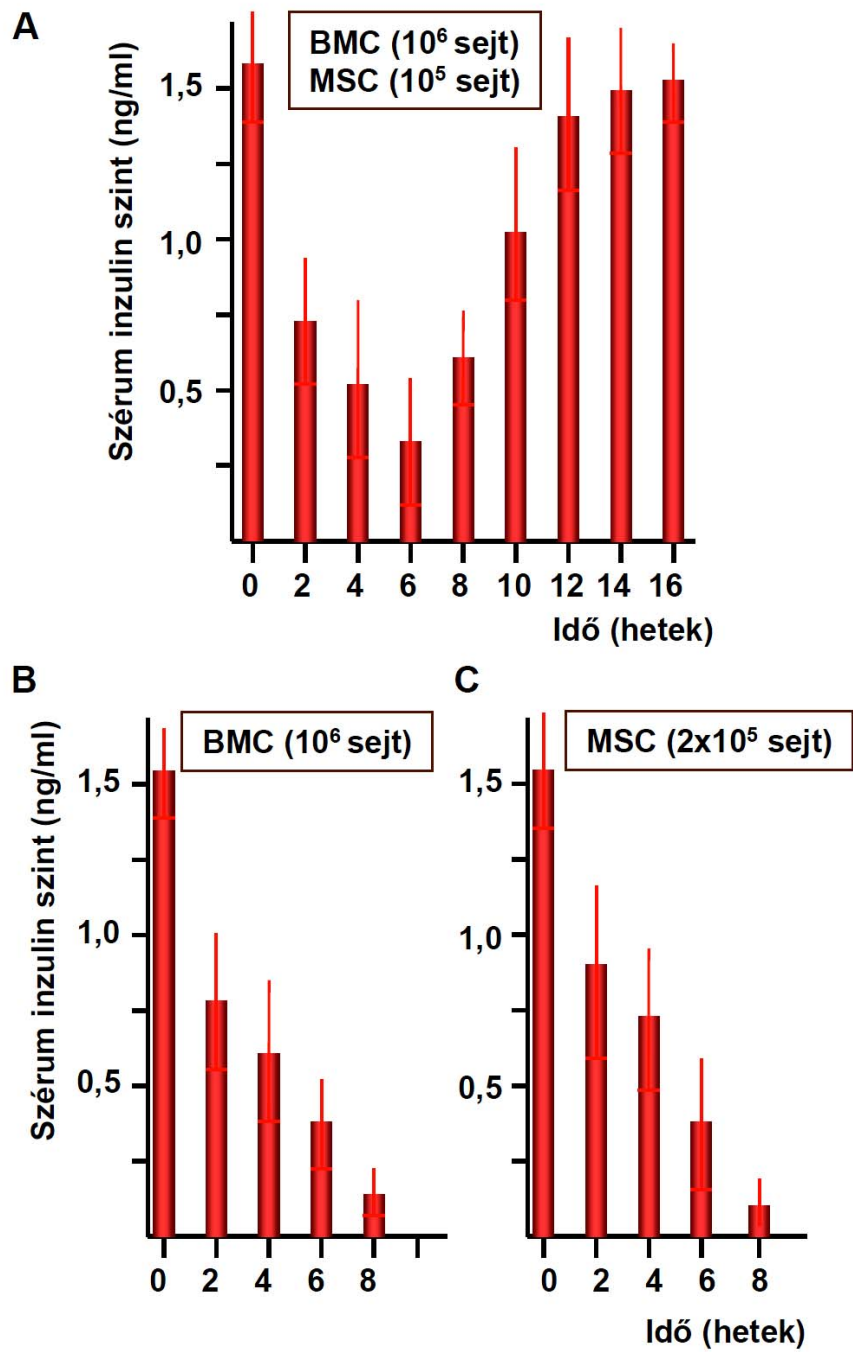
45. ábra. Az eltérő mértékű besugárzásnak kitett, majd csontvelő transzplantált kísérleti állatok vércukorértékeinek alakulása. (A) Csak STZ-vel kezelt egerek (n=6); (B-E) Cukorbeteg (STZ kezelt) állatok, amelyeket a kezelés megkezdésétől számított 15. napon 10^6 BMC-vel transzplantáltunk (n=6). Az előkészítő kezelés rendre 900 cGy (B), 450 cGy (C), 250 cGy (D) és 150 cGy (E) TBI volt. (F) Egészséges kontroll állatok vércukorértékeinek alakulása 900 cGy TBI és BMT után (n=3). Minden szimbólum egy-egy állatot reprezentál. A szimbólum eltűnése a diagramról az adott állat pusztulását jelzi.



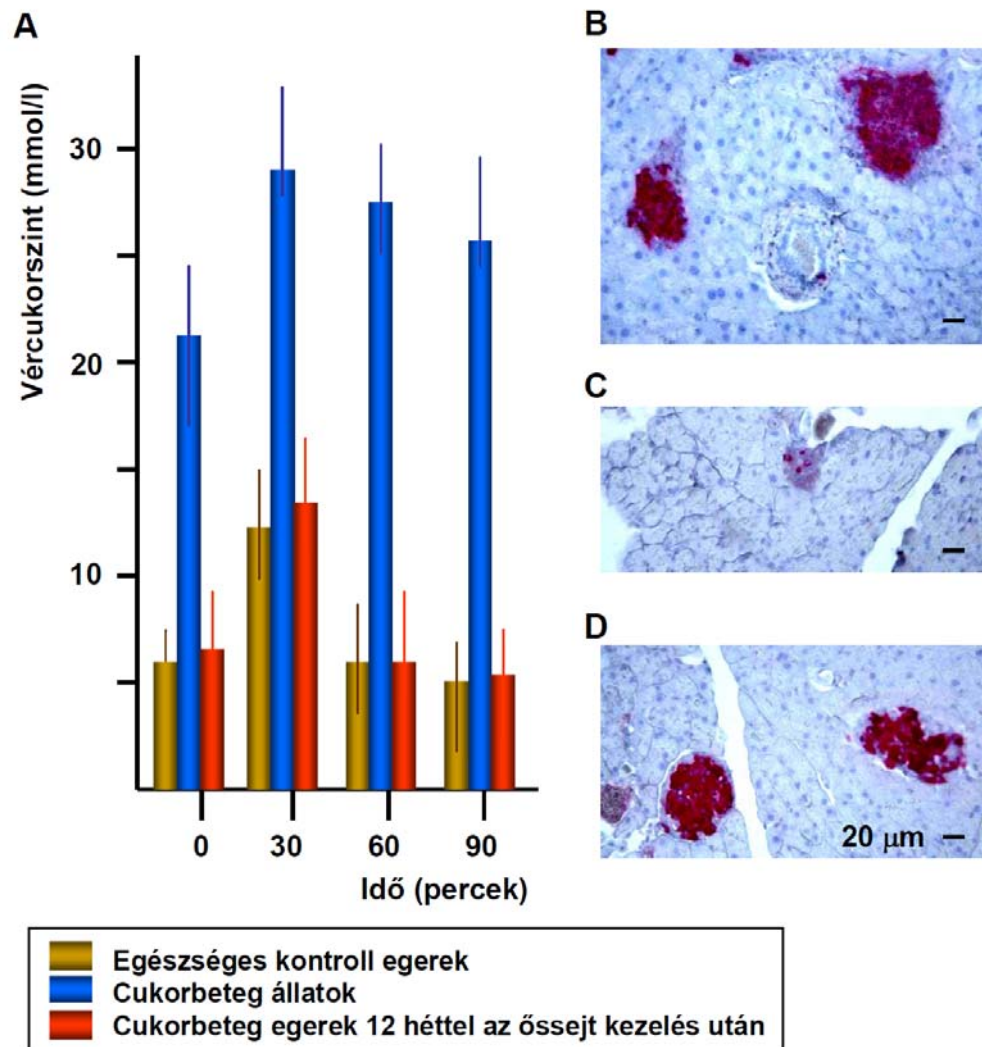
46. ábra. **Friss csontvelői magvas sejtek és mesenchymalis őssejtek együttes transzplantációja.** Az állatok az STZ kezelés megkezdését követő 15. napon, 250 cGy TBI-t követően, 10^6 színgeén BMC-t és *in vitro* kultúrában felszaporított színgeén, szemiallogén, vagy allogén MSC-eket kaptak intravénásan.



47. ábra. Friss csontvelői magvas sejtek és mesenchymalis őssejtek együttes adásával a diabetes gyógyítható. Az STZ kezelés első napjától számított 15. napon, 250 cGy TBI-t követően beadott 10^6 szingén BMC és 10^5 (A), vagy 5×10^4 (B) MSC együttes transzplantációja normalizálja a kísérleti állatok vércukorszintjét, és végleges gyógyulást eredményez. A $2,5 \times 10^4$ MSC-vel végzett kotranszplantáció már nem elegendő a gyógyuláshoz (C), míg önmagukban alkalmazva az MSC-k – legalábbis ebben a sejtszám tartományban - nincsenek hatással a vércukorszint alakulására (D) ($n=6$). Minden szimbólum egy-egy állatot reprezentál. A szimbólum eltűnése a diagramról az adott állat pusztulását jelzi.

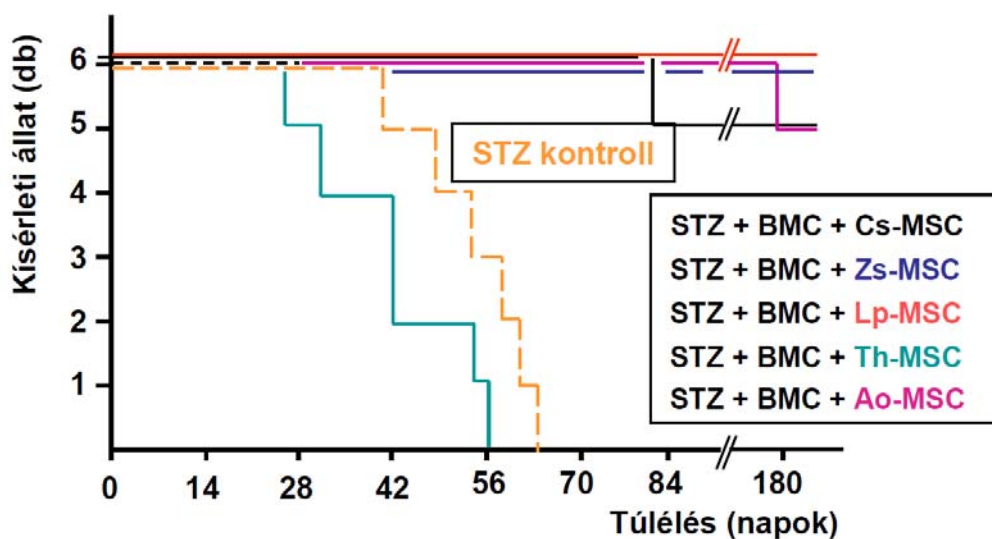


48. ábra. A cukorbeteg egerek szérum inzulin-szintje is normalizálódott friss csontvelői magvas sejtek és mesenchymalis őssejtek kotranszplantációját követően. (A) 10^6 BMC-vel és 10^5 MSC-vel, illetve (B) csak 10^6 BMC-vel, vagy (C) 2×10^5 MSC-vel oltott cukorbeteg egerek szérum inzulin szintjének alakulása a kísérlet során (átlag $\pm$ szórás, $n = 9$).



49. ábra. **Glükóz tolerancia teszt és szövettani regeneráció.** (A) Az egy éjszakán át éheztetett állatok 2g/testsúly kg glükózt kaptak intraperitoneálisan, majd a jelzett időpontokban mértük a vércukorértékeket (átlag $\pm$ szórás, $n=15$). Az egészséges kontroll (B), a cukorbeteg (C), és az STZ-vel kezelt, majd 10^6 BMC-vel és 10^5 MSC-vel transzplantált egerek (12 héttel a transzplantáció után) pancreasából készült metszetek inzulinra történt immunhisztokémiai jelölése jól mutatja a β -sejteknek az összejt kezelés hatására bekövetkező regenerációját.

Az MSC-k MHC haplotípusa nem befolyásolta az eredményeket. Az allogén (CD1) és szemiszingén ((C57Bl/6xDBA/2)F1) MSC-k éppoly hatékonyak voltak a kezelés során, mint a szingén (C57Bl/6) őssejtek (nem mutatjuk). Kulcsfontosságúnak bizonyult viszont az MSC-k szöveti eredete. Míg a Cs-, FCs, Zs-, Ao-, és Lp-MSC-k egyformán alkalmasak terápiás célra, a thymusból származó őssejtek – legalábbis ebben a kísérleti rendszerben – hatástalanok voltak. A BMC-kkel és Th-MSC-kkel végzett transzplantációt követően – eltérően az összes többi vizsgált sejt-kombinációtól – a cukorbeteg egerek nem gyógyultak meg (50. ábra). Szintén lényeges a transzplantáció időpontja. Ha az STZ kezelés megkezdésétől számított 8. napon végeztük a beavatkozást, akkor 9-ből 6 állat, a 15. napon transzplantáltak egerek esetében 9-ből 9 állat, míg a 29. napon kezelt cukorbeteg egerek közül egyetlen egy sem gyógyult meg. Az őssejt kezelésnek tehát van egy optimális időpontja, ami mindenképpen a betegség viszonylag korai fázisára esik (nem mutatjuk).

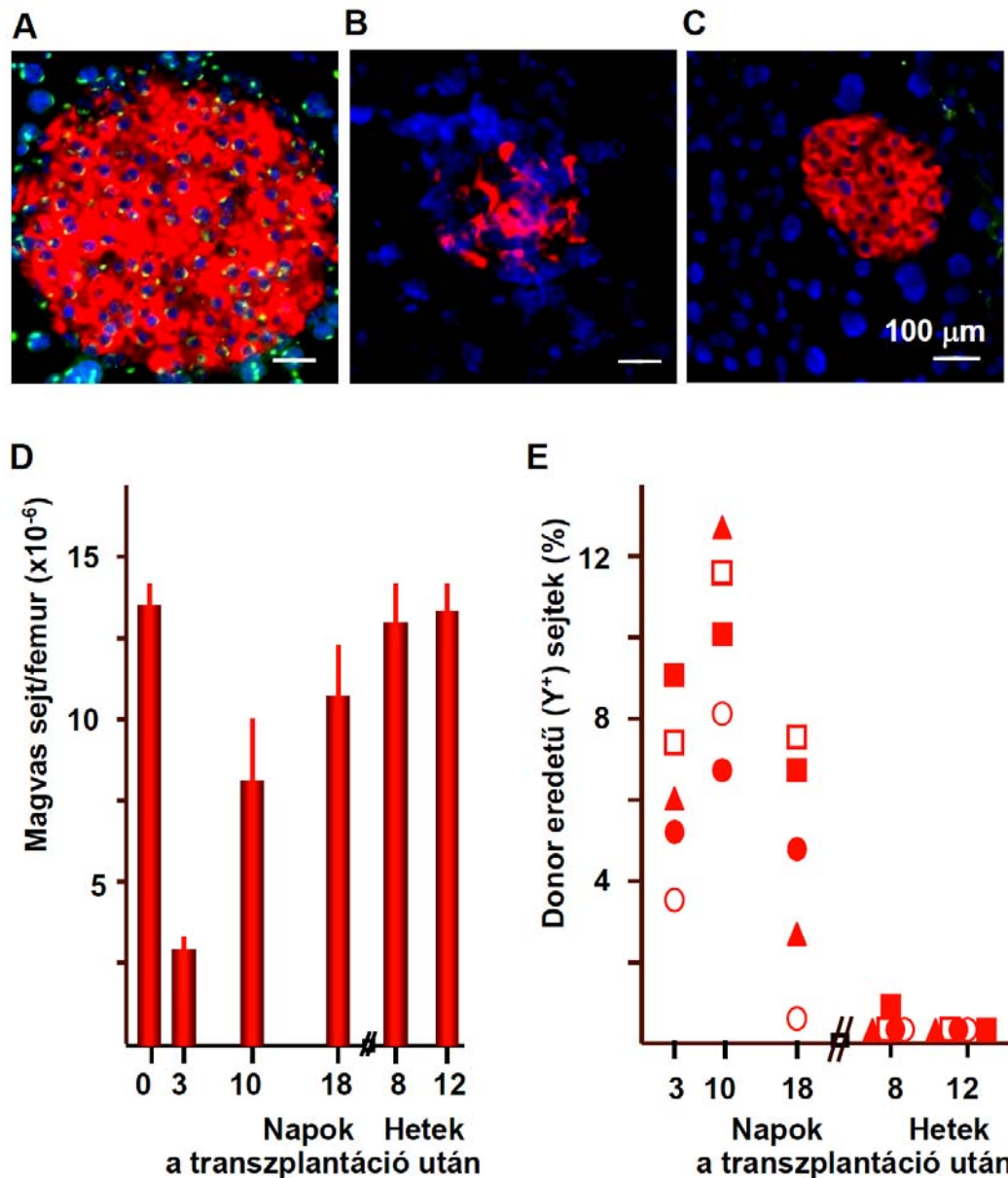


50. ábra. **Nem csak a csontvelői mesenchymalis őssejtek alkalmasak a diabetes gyógyítására.** Cukorbeteg (STZ kezelt) állatok túlélése, amelyeket a kezelés megkezdésétől számított 15. napon, 250 cGy TBI-t követően 10^6 szingén BMC és 10^5 csontvelői, zsírszövet, lép, thymus, vagy aorta fal eredetű MSC-vel transzplantáltunk. Jól látható, hogy a vizsgált MSC-k közül csak a thymus eredetű sejteknek nem volt terápiás hatásuk ebben a kísérleti rendszerben (n=6).

4.4.3.2. A kezelés egy endogén regenerációs folyamatot indít el a beteg állatokban

A gyógyult egerek új β -sejtjei elméletileg akár endogén, akár donor eredetű sejtekből (MSC és/vagy HSC) is kialakulhattak. Ennek tisztázására az STZ kezelés megkezdése utáni 15. napon 250 cGy TBI-nek kitett, majd 10^6 BMC-vel és 10^5 csontvelői MSC-vel transzplantált, gyógyult állatok pancreasából készített metszeteken egy Y kromoszóma-specifikus, fluoreszcens festékkel jelölt próba segítségével *in situ* hibridizációt (FISH) és inzulin specifikus immunfestést végeztünk. Mivel a *graft*ot alkotó sejtek mindegyike hím állatból származott, a recipiens egerek pedig nőtények voltak, a kettős jelölés segítségével eldönthettük, hogy a regeneráció során keletkezett új β -sejtek donor, vagy recipiens eredetűek-e. Kontrollként egészséges hím állatok hasnyálmirigyéből származó metszeteket használtunk. Mint a 51A-C ábra mutatja, az összejtekkel kezelt cukorbeteg egerek hasnyálmirigyében sem a transzplantációt követő 2., sem pedig a 82. (a szigetek regenerációja utáni) napon nem találhatók Y-kromoszómát hordozó, inzulin-pozitív sejtek. Donor eredetű MSC-kból származó – zölden fluoreszkáló - sejteket akkor sem találtunk a regenerálódott szigetekben, amikor a kísérletet CD1-TgEGFP egerek csontvelőjéből izolált MSC-kkel is megismételtük. A pancreas regenerációja során keletkezett új β -sejtek tehát recipiens eredetűek, vagyis az összejt kezelés egy endogén regenerációs folyamatot indított el a cukorbeteg állatok hasnyálmirigyében.

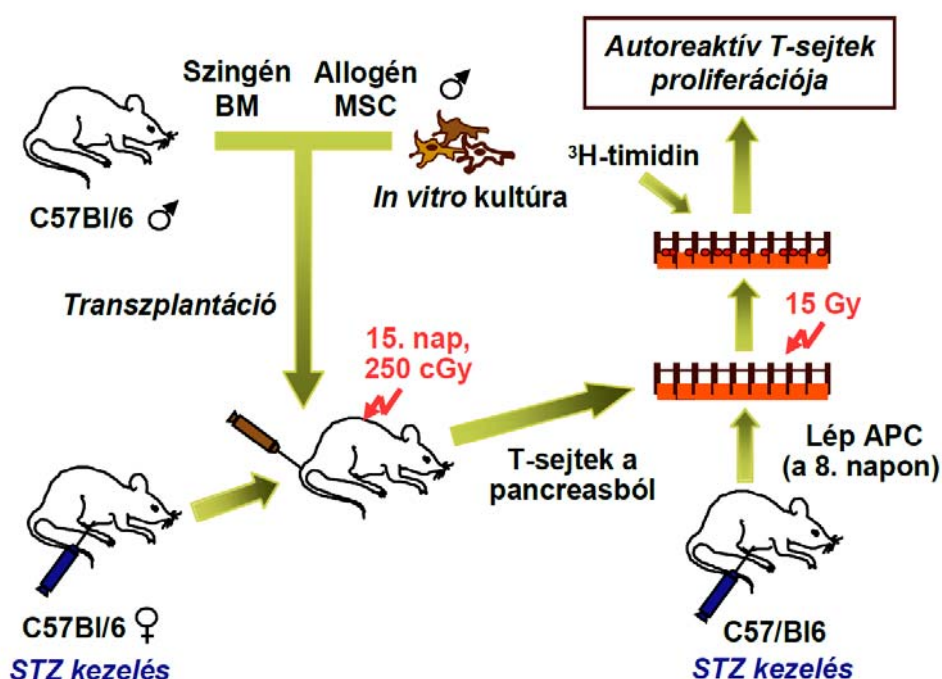
Kimerizmus csak a transzplantált állatok csontvelőjében alakult ki, és ott is csak átmenetileg. A transzplantációt követő 10. napon mintegy 6-12% Y-kromoszóma pozitív magvas sejtet találtunk a BMC-vel és MSC-vel oltott állatok csontvelő mintáiban, ezt követően azonban a donor sejtek aránya a vérképző rendszerben is gyorsan csökkent (51D, E ábra). A kimerizmust a friss csontvelő *graft*ban található hematopoetikus sejtek hozták létre, mivel zölden fluoreszkáló stroma elemeket akkor sem tudtunk kimutatni a recipiensekben, amikor CD1-TgEGFP egerek MSC-ivel végeztük a beavatkozást. EGFP-t expresszáló sejtek egyébként a gyógyult állatok más szerveiben (máj, lép, tüdő) sem fordultak elő és daganat keletkezését sem tapasztaltuk kísérleti állatainkban (nem mutatjuk).



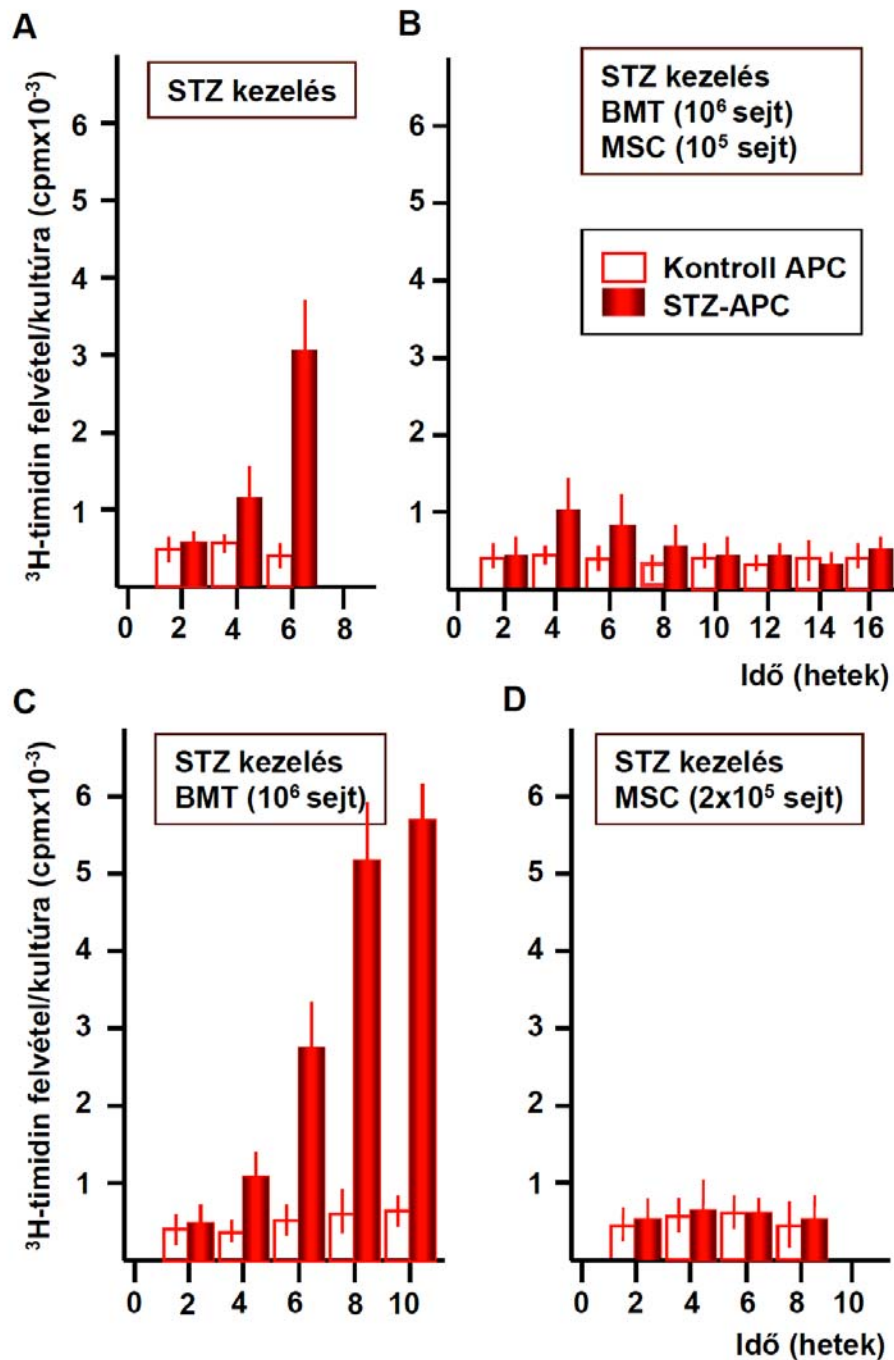
51. ábra. A Langerhans-szigetek regenerációja során keletkező új β -sejtek endogén eredetűek. (A) Egészséges hím C57Bl/6 egér, (B) STZ kezelt nőstény C57Bl/6 egér (14 nappal a kezelés megkezdése után), és (C) összejtekkel kezelt, korábban cukorbeteg állat (a kísérlet 84. napján) pancreas metszete. A sejtmagok kékek (DAPI jelölés), az inzulin vörös (immunhisztokémia), az Y kromoszómák pedig zölden fluoreszkálnak (FISH). (D) A magvas sejtek számának alakulása a csontvelőben a transzplantáció után (átlag $\pm$ szórás, $n=9$), és (E) ezen belül az Y kromoszóma pozitív (donor eredetű) sejtek százalékos aránya ($n=5$).

4.4.3.3. A mesenchymalis őssejtek a β -sejt specifikus T-sejt választ is gátolják kísérleti rendszerünkben

A β -sejtek STZ-vel indukált tömeges pusztulását gyulladásos és részben autoimmun reakció(k) kísérik a szervezetben (Paik SG et al, 1980). Kézenfekvőnek tűnt tehát, hogy az MSC-k elsősorban ezeket a folyamatokat gátolva járulnak hozzá a cukorbeteg egerek gyógyulásához. Ezt tisztázandó végeztük el a 52. ábrán vázolt kísérletet. T-sejteket izoláltunk a nem transzplantált, a csak BMC-kkel, csak MSC-kkel, illetve a kettő kombinációjával oltott cukorbeteg egerek hasnyálmirigyéből. Antigén-bemutató sejt-ként (APC) ugyancsak STZ-vel kezelt egerek lépéből származó adherens sejteket alkalmaztunk. Ezek az APC-k csak azokat a pancreasból származó, autoreaktív T-sejteket készítették intenzív osztódásra antigén (pancreas kivonat) jelenlétében, amelyek a nem transzplantált (53A ábra), vagy a csak BMC-kkel oltott állatokból származtak (53C ábra). Ugyanakkor a kizárólag MSC-kkel (53D ábra), vagy BMC-kkel és MSC-kkel együtt oltott (53B ábra) egerek T-sejtjeinek proliferációja egészen csekély mértékű volt.



52. ábra. A cukorbeteg állatok hasnyálmirigyében megjelenő autoreaktív T-sejtek kimutatására szolgáló kísérlet vázlata



53. ábra. A mesenchymalis őssejtek gátolják a β -sejt specifikus T-sejt választ. STZ-vel kezelt, de nem transzplantált (A), STZ-vel kezelt, majd BMC-vel és MSC-vel oltott, (C) STZ-vel kezelt és csak BMC-vel transzplantált, illetve (D) STZ-vel kezelt és csak MSC-vel oltott állatok pancreasából izolált T lymphocytaikat (2×10^5 sejt/lyuk) egészséges, vagy 8 nappal korábban STZ-vel kezelt egerek lépéből izolált adherens sejtekkel (5×10^4 sejt/lyuk) kevertünk össze 96 lyukú, lapos fenékű tenyésztőtálcákon. A kultúrákat 72 óra elteltével $1 \mu\text{Ci}$ ^3H -timidinnel jelöltük és további 18 óra múlva learattuk a sejteket. A beütésszámokat (cpm) folyadékszintillátorban mértük. Három kísérlet átlaga $\pm$ szórás ($n=3$).

A megfigyelt T-sejt válasz specificitását úgy igazoltuk, hogy az STZ-vel kezelt (cukorbeteg), vagy ovalbuminnal (OVA) oltott (de nem cukorbeteg) egerekből származó T lymphocytákat cukorbeteg, vagy kezeletlen kontroll állatok lépéből származó APC-kkel kevertük össze. Az autoimmun T-sejtek osztódását csak a cukorbeteg egerekből származó APC-k tudták kiváltani, míg a kontroll állatok APC-inek nem volt ilyen hatása. Ha a kontroll APC-khez *in vitro* pancreas kivonatot is adtunk, akkor azok is képessé váltak, az autoreaktív T-sejtek aktiválására. Az OVA-specifikus T lymphocyták viszont csak akkor osztódtak a tenyészetekben, ha az APC-ken kívül OVA-t is adtunk a kultúrákhoz (16. táblázat).

16. táblázat. Az STZ-vel kezelt állatok lépéből nyert antigén bemutató sejtek pancreas eredetű saját struktúrákat mutatnak be, amiket az autoreaktív T-sejtek felismernek^a

Antigén-bemutató sejt	T-sejt	Antigén <i>in vitro</i>	³ H-timidin felvétel
STZ-kezelt egerek lépéből	STZ-kezelt	-	3255 ± 344*
	egér	Pancreas kivonat	8762 ± 744*
	pancreasból	OVA	3420 ± 320*
	OVA-nal	-	598 ± 52
	immunizált egér	Pancreas kivonat	604 ± 59
	nyirokcsomóból	OVA	4472 ± 418*
Kezeletlen kontroll egerek lépéből	STZ-kezelt	-	505 ± 33
	egér	Pancreas kivonat	7010 ± 698*
	pancreasból	OVA	511 ± 64
	OVA-nal	-	523 ± 69
	immunizált egér	Pancreas kivonat	544 ± 61
	nyirokcsomóból	OVA	8245 ± 780*

^aHárom kísérlet átlaga ± szórás; * p < 0,05.

Mivel azt már korábban kimutattuk (ld. 4.4.3.1.), hogy az MSC-k önmagukban adva nem befolyásolják a betegség lefolyását, megállapíthatjuk, hogy az MSC-k adásának köszönhető immunszuppresszió szükséges, de - önmagában - nem elégséges feltétele a diabetes sikeres összejtterápiájának. Így érthető az is, hogy cyclosporin A (CsA) adagolásával (10 mg/testsúly kg, a 10. 17. és a 19. napon) az MSC-k nem helyettesíthetők kísérleti rendszerünkben (nem mutatjuk).

5. Megbeszélés

5.1. A mesenchymalis ősz-, vagy stroma sejtek eredete és sokfélesége

Az MSC-k biológiájának egyik legkevésbé ismert és mindmáig alig-alig tanulmányozott területe ezen sejtek ontogenezise (Javazon EH et al, 2004; Pevsner-Fischer M et al, 2011). Nem tudjuk, hogy honnan erednek, vagyis az egyedfejlődés során mikor, hol és milyen sejtípus(ok)ból alakulnak ki az MSC-k. Egyáltalán beszélhetünk-e egy egységes MSC fejlődési vonalról, vagy a különböző szervekből, illetve szövetekből izolált stroma sejtek részben eltérő felszíni markerei és differenciálódási képessége (ld: 4.1.-ben) különböző – esetleg eltérő eredetű - MSC populációk (vagy szubpopulációk) létezésére utal? E kérdések megválaszolása igen nehéz, mivel nem ismerünk olyan gént, vagy géneket, amik csak az MSC-kben fejeződnek ki, így a hagyományos „lineage tracing” módszerek esetükben nem alkalmazhatók. Az egyik lehetséges – indirekt – megközelítés a különböző szöveti eredetű MSC-kben: (i) az őssejtek esetleges pluripotenciájával összefüggésbe hozható, (ii) a már számos munkacsoport által leírt, ún. „klasszikus MSC”, (iii) a mesenchymális sejtekre általában jellemző, valamint (iv) a mesoderma szegmentációjában, illetve a somiták fejlődésében szerepet játszó gének kifejeződésének összehasonlító vizsgálata volt a csontvelőből, zsírszövetből, thymusból, lépből, és aorta falból izolált MSC populációkban (ld: 4.2. és 4.3.-ban).

Az elmúlt években számos olyan publikáció jelent meg, amelyek mind az egér (Anjos-Afonso F and Bonnet D, 2007), mind az emberi eredetű (Gang EJ et al, 2007) stroma kultúrákon belül egy olyan kisebb sejtpopulációt véltek felismerni, mely bizonyos pluripotencia géneket - elsősorban a *Pou5f1/Oct-4*-et – is expresszálja. Ezzel szemben Lengner és mtsai (Lengner CJ et al, 2007) – számos más munkacsoporttal együtt - kizárták egy pluripotens szubpopuláció jelenlétét az MSC kultúrákban. Saját eredményeink is ezt igazolják, mivel egyik MSC tenyészetünkben sem találtunk kimutatható mennyiségű *Pou5f1/Oct-4*, *Nanog*, vagy *Rex-1/Zfp-42* mRNS-t, míg a kontroll ES sejtek nagy mennyiségben fejezték ki ugyanezeket a géneket. Így elvethetjük azt a hipotézist, miszerint a különböző *in vitro* tenyészetekben növekedő stroma populációkon belül létezik egy pluripotencia géneket (is) kifejező sejtcsoport, ami a valódi – önfenntartó osztódásokra is képes – mesenchymalis őssejtekkel azonos. A születés után a szervezetben előforduló MSC-k tehát semiképpen sem tekinthetők valamiféle korai “embrionális maradványnak”.

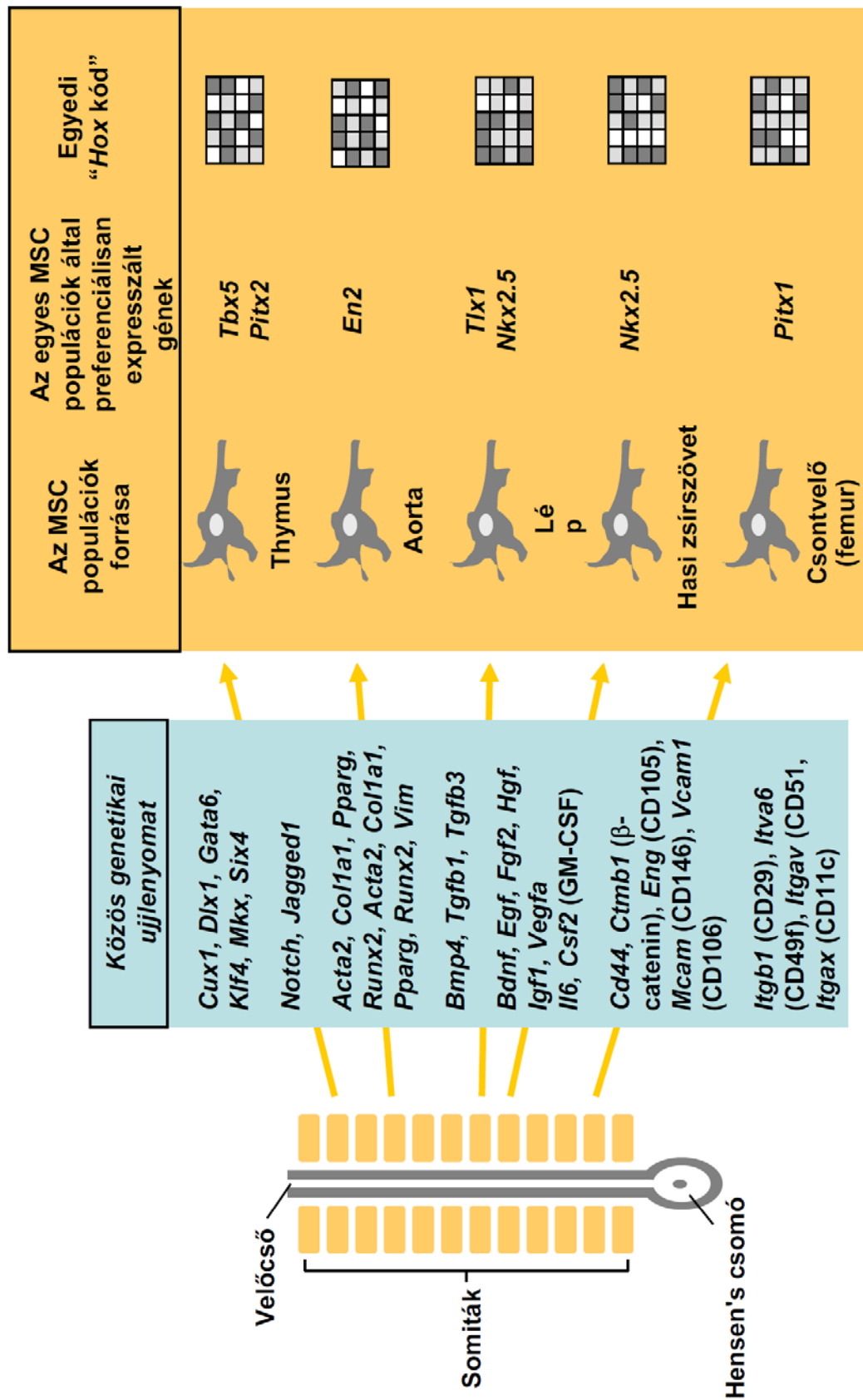
Bár az általunk vizsgált, különböző eredetű egér MSC populációk - FCs-MSCs, Cs-MSCs, Zs-MSCs, Th-MSCs, Lp-MSCs, és Ao-MSCs - felszíni markereiket tekintve részben

eltérőnek bizonyultak (ld: 4.1.1.-ben), megfelelő induktorok jelenlétében mindegyikük képes volt adipocytá és osteoblast irányú differenciálódásra. Az ehhez szükséges „mester transzkripciós faktorokat” kódoló gének (*Bglal1*, *Runx2* és *Pparg*) kifejeződése ugyancsak egyértelmű volt az összes sejtpopulációban. Ezen túlmenően - Menicanin és mtsai (Menicanin D et al, 2009) korábbi eredményeivel összhangban - valamennyi MSC mintában nagyszámú, a mesenchymális és/vagy mesodermális eredetű sejtekre jellemző marker expresszáldott, mint például az α -simaizom aktin, kollagén I α -lánc, vimentin, növekedési faktorok (BDNF, EGF, FGF2, HGF, IGF1, VEGF α), morfogének (BMP4, TGF- β 1, TGF- β 3), citokinek (IL-6, GM-CSF), sejtheadhéziós molekulák (CD44, β -catenin, endoglin, MCAM, VCAM1), és integrinek (CD29, CD49f, CD51, CD11c). Komolyabb mennyiségi eltéréseket is csak néhány szekretált, illetve sejtfelszíni molekula – például a BMP6, az FGF10 és a HGF - génjének kifejeződésében találtunk (ld: 4.2.-ben). Ennek a közös – minden átlunk vizsgált MSC populációban kifejeződő – genetikai ujjlenyomatnak további fontos alkotói a *Cux1*, *Klf4*, és *Gata6* gének. Ezek az embrionális fejlődés során, az organogenezisben, valamint a sejtosztódás és differenciálódás szabályozásában kulcsszerepet játszó transzkripciós faktorokat kódolnak (Sansregret L and Nepveu A, 2008; Suzuki E et al, 1996). Összeeseng ezzel, hogy az emberi MSC-k önfenntartó képessége erőteljesen csökken, ha a *GATA6* gén működését kis gátló RNS-el csendesítik (Kubo H et al, 2009). A Gata4 transzkripciós faktor a csontvelői eredetű sejtek kivételével valamennyi MSC populációban kifejeződött. A *Gata4* gén expresszióját elsősorban olyan jelátviteli utak szabályozzák, amelyek az endoderma és a mesoderma korai specifikációja, valamint a zsigeri szervek egy részének (szív, bél, máj, pancreas) kialakulása során nélkülözhetetlenek (Watt AJ et al, 2007). Az *Nkx2.5*, ami az Ao-MSK-ben és a Lp-MSK-ben fejeződött ki egyértelműen, ugyancsak képes fokozni a *Gata4* gén átíródását (Riazi AM et al, 2009).

Figyelemre méltó, hogy a csontvelő, a lép és az aortafal eredetű MSK-ben *Pax3* specifikus mRNS is kimutatható. Morikawa és mtsai (Morikawa S et al, 2009) korábban leírták, hogy az ontogenezis során megjelenő MSK-k „első hulláma” a dúclécből ered, így felmerülhet, hogy a születés utáni MSK készlet egy része is ectodermális eredetű. Ennek azonban ellentmond, hogy a *Pax3* kifejeződése azokra a somita területekre is jellemző, melyekből a későbbiekben az embrionális vázizom elődsejtjei, illetve a fejlődő végtagbimbók izomsejtjeinek progenitorai alakulnak ki (Lagha M et al, 2010). Ráadásul egyetlen más átlunk vizsgált, az idegrendszer fejlődésében szerepet játszó transzkripciós

faktort kódoló gén (*Arx*, *Dmbx1*, *Lbx1*, *Otx2*, *Phox2b*, *Prop1*, és *Six3*) sem fejeződött ki MSC mintáinkban. Mindezek alapján tehát a csontvelőből (femur), zsírszövetből, thymusból, lépéből és aorta falból izolált MSC populációk mesodermális eredetűek és részben közös „genetikai ujjlenyomattal” rendelkeznek, ami (i) közös eredetűekre, és/vagy (ii) párhuzamos fejlődésükre utalhat (54. ábra). (Meg kell azonban jegyezni, hogy a craniofaciális területről származó MSC-ket nem vizsgáltunk, így ezek ectodermális eredetét nem vitathatjuk).

Folytatva a fenti gondolatmenetet, a *Dlx1*, a *Six4* és az *Mkx* gének minden MSC tenyészetben megfigyelhető, erőteljes kifejeződése alapján közelebbről is meghatározhatjuk az ontogenezisnek azt a szakaszát, amikor ezek a sejtpopulációk kialakultak (ld: 4.3.2.-ben). A *Dlx* gének az agy fejlődésében és az egyes agyterületek elhatárolódásában, az arckoponya struktúráinak, valamint az axiális és az appendikuláris csontváz kialakításában játszanak szerepet (Kraus P and Lufkin T, 2006). A *Six4* az embrionális élet 8. napjától kezdődően időben átfedő jelleggel, egymás után íródik át a somitákban, a végtagbimbókban, a gerincvelő hátulsó dúcaiban és a kopoltyúívekben, végül egyes belső szervekben (Ando Z et al, 2005). Emellett a *Six4* fehérje meghatározó szerepet játszik a sejtciklus néhány ellenőrző pontjának szabályozásában is (Ford HL, 1998). Az *Mkx* az embrionális élet 9. napjától fejeződik ki a dermomyotom ventrolaterális területein úgy, hogy egy anterior posterior irányú gradienst hoz létre. A somitogenezis későbbi szakaszában az *Mkx* átíródik az inak kialakításáért felelős syndetomban és a sclerotom eredetű, kondenzálódó mesenchymaterületeken, amelyek – többek között - a proximális bordákat és csigolyatesteket hozzák majd létre (Anderson DM et al, 2006). Az *Mkx* fehérje homeodoménje révén képes kötődni a megfelelő DNS szakaszokhoz megakadályozva az érintett embrionális szövetek myogén irányú differenciálódását (Anderson DM et al, 2009). A génkiütött egerek inai testszerte alulfejlettek. Az inak össztömegének csökkenése ellenére azonban, az *Mkx*^{-/-} állatok farki ínkötegeiben a sejtszám nem nagyon tér el a vad típusú egerektől (Ito Y et al, 2010; Liu W et al, 2010). A különböző MSC populációk tehát mindenképpen a poszt-szegmentációs mesodermából, azon belül valószínűleg a somiták területéről eredeztethetők. E mellett szól az is, hogy a mesoangioblastok, egy korai multipotens mesodermális progenitor sejttípus (Esner M et al, 2006), és a poszt-natális leszálló aorta símaizomsejtjei is a somitákból származnak (Wasteson P et al, 2008). Sőt, Pouget és mtsai (Pouget C et al, 2008) szerint a pericyták, valamint a törzs és a végtagok vaszkuláris símaizomsejtjei, illetve az aortafali sejtek egy része szintén a sclerotomból származik.



54. ábra. A különböző eredetű MSC populációk génexpressziós mintázata részben eltérő – a sejtek egyértelmű „pozicionális memóriával” rendelkeznek

Ugyanakkor azt is igazoltuk, hogy a különböző eredetű MSC populációk egyedi „Hox kóddal” vagy „Hox gén expressziós ujjlenyomattal”, azaz egyértelmű „pozicionális memóriával” rendelkeznek (ld: 4.3.1.-ben). Korábban Ackema és Charité (Ackema KB and Charité J, 2008) már leírták, hogy az egerek különböző csontjaiból izolált MSC-k *Hox* gén mintázata egymástól eltérő. Az emberi test számos, jól körülhatárolt anatómiai területéről származó fibroblastok eredete *HOX* gén expressziós mintázatuk alapján meghatározható (Chang HY et al, 2002). A símaizomsejtek (Chi JT et al, 2007) és a zsírsejtek (Gesta S et al, 2006) *Hox* kódja szintén pontosan kijelöli azok eredeti pozicionális identitását a szervezeten belül. A *Hox* gének tehát, amelyek az embrionális fejlődés korai szakaszában a szegmentálódási folyamatokat és a testtengelyek kialakulását szabályozzák, a felnőtt szervezetben azt reprezentálják, hol is helyezkedik el az adott sejt a soksejtű szervezeten belül (Wang KC et al, 2009). A „klasszikus” *Hox* gének mellett néhány olyan, elsősorban szintén homeodomén tartalmú transzkripciós faktort kódoló gént is azonosítottunk, amelyek preferenciálisan csak egy-egy, meghatározott eredetű MSC populációban fejeződnek ki erőteljesen (ld: 4.3.2.-ben). A *Tbx5* és az *Fgf10* génekről átíródott mRNS-ek például kifejezetten a thymus eredetű MSC-kre jellemzőek. Ez nem meglepő, hiszen közismert, hogy FGF10 hiányában a thymus fejlődése korai embrionális állapotban leáll (Li QY et al, 1997), mivel a thymus epithel sejtek csak a *Tbx5*/FGF10 jelátviteli út hibátlan működése esetén képesek megfelelően osztódni és differenciálódni (Revest JM et al, 2001). Ugyancsak bizonyított, hogy a *Tbx5* számos gerinces faj, köztük az egér és az ember mellső/felső végtagjainak kialakításában is létfontosságú szerepet játszik. Olyannyira, hogy *Tbx5* hiányában még a végtagbimbók sem alakulnak ki (Agarwal P et al, 2003). A *Tbx5* ugyanis közvetlenül aktiválja az *Fgf10* gént, míg az FGF10 fehérje pozitív visszacsatolás útján fokozza a *Tbx5* expresszióját. A *Tbx5* mutációja áll az örökletes Holt-Oram szindróma hátterében is (Li QY et al, 1997), ami az érintettekben a felső végtagok és a szív fejlődési rendellenességeihez vezet. Szintén a Th-MSC-kre jellemző a *Pitx2* expressziója. Ez a transzkripciós faktor is nélkülözhetetlen a mellső végtagok normális fejlődése során. Túltermeltetése súlyos ín, izom és csont fejlődési rendellenességeket okoz (Holmberg J et al, 2008). A *Tlx1* mRNS különösen nagy mennyiségben keletkezik a lép eredetű MSC-kben. A *Tlx1* fehérje elengedhetetlen a lép kialakulása és növekedése során (Roberts CW et al, 1994). A *Tlx1*-null mutáns egerek életképesek de hiányzik a lépük. Előtelepe az embrionális élet 13.5 napjáig normálisan fejlődik, de azt követően - feltehetően az elégtelen mesenchymalis proliferáció okán - már nem növekszik tovább (Kanzler B and Dear TN, 2001; Brendolan A et al, 2007). A fejlődő lép mesenchymája

szoros kapcsolatban áll a dorsálisan fejlődő pancreastelep mesenchymájával és mindkettő kifejez egy másik, evolúciós értelemben szintén konzervált homeobox gént, az *Nkx2.5*-öt, ami az Lp-MSC-kben is expresszálódik. Az *Nkx2.5* fehérje – többek között – gátolja a myofibroblastok differenciációját, aminek fontos szerepe lehet a sebgyógyulásban, illetve a szöveti homeosztázis fenntartásában (Hu B et al, 2010). Az sem meglepő, hogy a *Pitx1* transzkripciós faktor, amely a hátsóvégtag elkülönülésének és további struktúráinak kialakításában játszik szerepet (Meijlink F et al, 1999), kizárólag a 14 napos és a fiatal felnőtt állatok – femurból izolált - csontvelői MSC-iben jelenik meg. Más stroma sejt tenyészetekből nem tudtuk kimutatni a *Pitx1* mRNS-t. Az Ao-MSC-kre az *En2* és a *Gdf6* gének kifejeződése a jellemző. Az *En2* transzkripciós faktor a mesencephalon és a metencephalon kialakításában, a cerebellum helyének kijelölésében, valamint a feji izmok elhatárolódásában játszik fontos szerepet (Sarnat HB et al, 2002; Herrup K et al, 2005). Az Ao-MSC-kben kifejeződő *En2* gén szerepét jelenleg nem ismerjük. A másik, ugyanebben az MSC populációban erőteljesen expresszálódó gén, a *Gdf6* viszont fontos lehet az aortafal rugalmasságának megőrzésében. A *Gdf6* által kódolt BMP-13-ról tudjuk, hogy az inak és porcok esetében gátolja a kalcifikációt, azaz a csont irányú differenciálódást (Chang SC et al, 1994). Kötőszöveti sérülést követő gyógyulási folyamatokban a BMP-13 új inak/inszalagok kialakítását, és proteoglycanok – chondrocyta markerek – képződését indukálja (Bobacz K et al, 2002). Az örökletes Klippel-Feil szindróma hátterében a BMP-13 mutáció okozta inaktiválódása áll. A betegség a nyakcsigolyák veleszületett fúziójával jár (Tassabehji M et al, 2008). A génkiűtött egérmodellben ehhez az inak, porcok és az ízületek kialakulásának rendellenességei is társulnak (Settle SH Jr et al, 2003).

Összefoglalásként tehát megállapíthatjuk, hogy a különböző szervekben található mesenchymális ős-, vagy stroma sejt populációk az ontogenezis során a mesoderma szegmentálódását (a somiták kialakulását?) követően jönnek létre, az egyes testszervényekben külön-külön meginduló, de párhuzamos fejlődési folyamat eredményeként. Ezek a sejtpopulációk határozott pozicionális memóriával rendelkeznek, ami részben eltérő *Hox* génexpressziós mintázatukon, részben néhány - elsősorban (vagy kizárólag) az adott szervre, illetve testszervényre jellemző - kulcsfontosságú transzkripciós faktort kódoló gén kifejeződésén alapul. Ilyen gének például hátsó végtagok fejlődését meghatározó *Pitx1*, a thymus kialakulása során nélkülözhetetlen *Tbx5*, és a normális lépfejlődéshez szükséges *Tlx1* (54. ábra). Más szóval, a különböző MSC populációk részben eltérő génexpressziós profilja tükrözi a sejtek eredeti (*in situ*) anatómiai lokalizációját.

Mivel ezt a – részben egyedi - génexpressziós profilt az MSC-k *in vitro* tenyésztésük során tartósan (esetünkben 10-15 átvitel után keresztül) megőrzik, eredményeink a regeneratív orvoslás számára is fontosak lehetnek. Bár sejtenyészeten valamennyi MSC képes osteoblast, adipocita és chondrocyta irányba differenciálódni, egyáltalán nem biztos, hogy *in vivo* regeneratív potenciáljuk is azonos (Al-Nbaheen M et al, 2012). A szöveti regeneráció során esetenként meghatározó jelentőséggel bírhat, hogy az MSC graft és a sérült célszövet/szerv topográfiai memóriája mennyire hasonló, vagy eltérő. Leucht és mtsai például leírták, hogy csontsérülések regenerációja során a különböző eredetű MSC-k nem feltétlenül helyettesíthetik egymást. A mandibulából izolált - *Hoxa11* negatív - csontvelői MSC-k mind a törött állkapocs, mind a sérült tibia regenerációját elősegítették. A sípcsontból izolált – ugyancsak csontvelői eredetű, de *Hoxa11* pozitív - MSC-k viszont csak a tibia csontállományába tudtak megfelelően beépülni, a sérült állkapocsban inkább hegeseledést okoztak (Leucht P et al, 2008). A különböző emberi MSC-k – szöveti eredetüktől függően - eltérő mértékben képesek elősegíteni a szív (Gaebel R et al, 2011), vagy a dystrophiás izom (Vieira NM et al, 2010) regenerációját. A tüdőből származó MSC-k néhány, a tüdő fejlődése során nélkülözhetetlen transzkripciós faktort kódoló gént is expresszálnak (Bozyk PD et al, 2011) és a keringésbe juttatva őket elsősorban a légzőszervbe vándorolnak (Badri L et al, 2011). A szívből és a veséből származó MSC-kben szintén kifejeződnek az adott szervre jellemző gének (Pelakanos RA et al, 2011). Zanini és mtsai pedig elsősorban a hasnyálmirigyből izolált MSC-ket tudták inzulin-termelő sejtekké differenciáltatni *in vitro* kultúrában (Zanini C et al, 2011). Mindez természetesen nem jelenti azt, hogy a különböző eredetű MSC-k – már csak a génexpressziós mintázatukban tapasztalt nagyfokú átfedés miatt is – soha, semmilyen kísérleti rendszerben, vagy terápiás beavatkozás során ne helyettesíthetnék egymást. Inkább arról van szó, hogy érdemes megfontolni, milyen eredetű MSC-kel lehet a legnagyobb valószínűséggel elérni a kívánt célt.

5.2. A vérképző őse- és elődsejtek osztódásának, differenciálódásának és mobilizációjának szabályozása

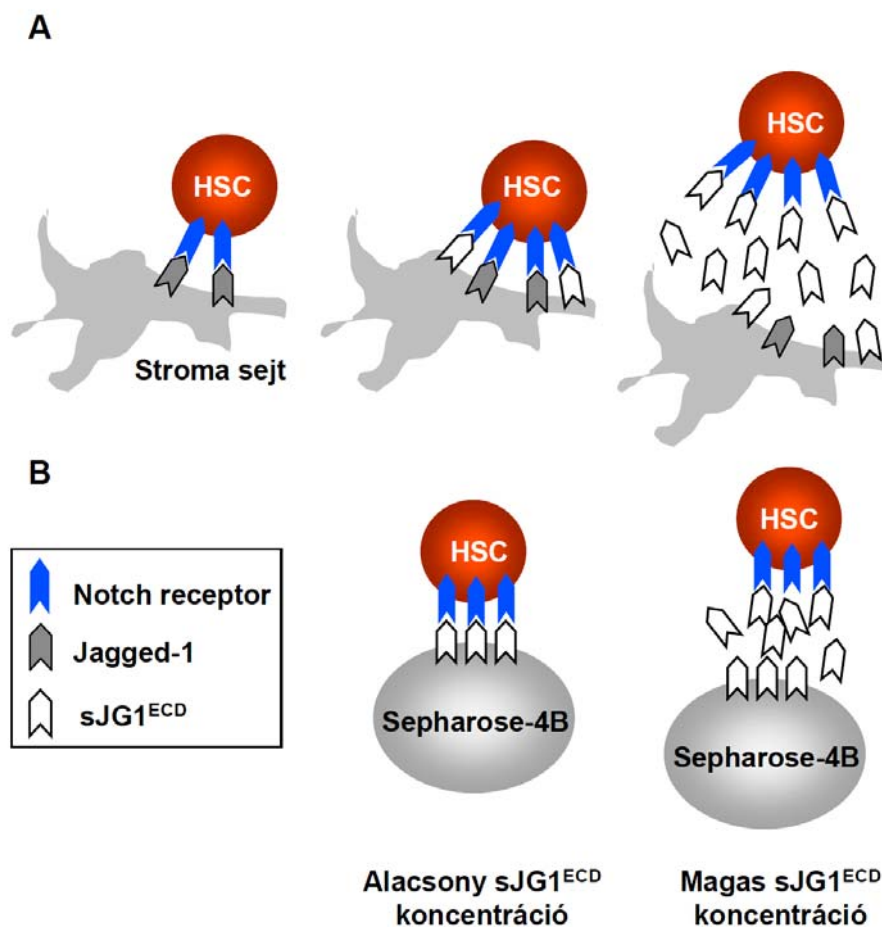
Számos, főként hematológiai eredetű betegség (leukemia, lymphoma, stb.) egyetlen kuratív terápiája a csontvelő-, pontosabban hematopoetikus őssejt transzplantáció. Sajnos a megfelelő, fiatal és egészséges donorok száma erősen korlátozott, így a beavatkozás nagyon sok beteg számára elérhetetlen. A donorhiányt jelentősen enyhítené, ha a rendelkezésünkre álló HSC-ket *in vitro* kultúrában is tudnánk szaporítani, ezt azonban

mind a mai napig nem sikerült megvalósítani (Dahlberg A et al, 2011). A HSC „niche” rendkívüli összetettsége (ld: 1.3.-ban) a legfőbb akadály, amit egyelőre nem tudunk tenyésztőedény(ek)ben reprodukálni. Ezért fontos a HSC „niche” felépítésében és működésében szerepet játszó – főként MSC eredetű (Morrison SJ and Spradling AC, 2008; Wang LD and Wagers AJ, 2011) - sejtek, valamint jeltovábbító utak minél részletesebb vizsgálata. Mi a Notch rendszernek és egy, a stroma sejtek által nagy mennyiségben termelt lektinnek, a galektin-1-nek a vérképzés szabályozásában betöltött szerepét vizsgáltuk.

A Notch jeltovábbító rendszer szerepe a vérképző ős- és elődsejtek osztódásának és differenciálódásának szabályozásában már az 1990-es évek végén felmerült. Jones és mtsai (Jones P et al, 1998) leírták, hogy a Jagged-1 molekulákat kifejező stroma rétegen tenyésztett egér vérképző sejtek lágy-gél kultúrában több kolóniát képeznek, mint a Jagged-1 negatív stromán tenyésztett társaik. Hasonló eredményt kaptak, amikor emberi köldökzsínór vérből származó CD34⁺ sejteket inkubáltak Jagged-2-vel transzfektált fibroblastokon (Carlesso N et al, 1999). A Jagged és Delta-típusú Notch ligandumok szolubilis (Karanu FN et al, 2000; Han W et al, 2000), illetve a tenyésztőedények alján inszolubilizált formában is segítették a vérképző elődsejtek kolóniaképzését (Karanu FN et al, 2001; Ohishi K et al, 2002; Varnum-Finney B et al, 2003). Rövidesen azt is igazolták, hogy a folyamatosan aktív Notch1 mind *in vitro*, mind *in vivo* gátolja a HSC-k differenciálódását (Stier S et al, 2002). Ezért kezdtük el részletesen vizsgálni, hogyan befolyásolja a Jagged-1 extracelluláris doménjének megfelelő rekombináns fehérje (sJG1^{ECD}) szolubilis (monovalens), illetve Sepharose-4B gyöngyök felszínén inszolubilizált (multivalens) formája a HSC-k és a belőlük származó elkötelezett elődsejtek sorsát. Megállapítottuk, hogy az sJG1^{ECD} széles koncentráció tartományban (50 ng/ml – 10 µg/ml) - mind mono-, mind multivalens formában - növekedési kofaktorként szerepel a lágy-gélben kolóniát képező hematopoetikus elődsejtek (CFU-GEMM, CFU-GM, és BFU-E) számára (ld: 4.4.1.1.-ben). Ez azt jelenti, hogy a ligandum önmagában ugyan nem készíti osztódásra a kolóniaképző sejteket, de megfelelő citokinek (GM-CSF, EPO, IL3) egyidejű jelenlétében fokozza a proliferációjukat. Ugyanakkor az olyan „macskakő” kultúrákban (CAFC), ahol Jagged-1⁺ stroma sejt rétegen folyik a tenyésztés, az sJG1^{ECD}-nek részben bifázisos hatása volt. Magas koncentrációban fokozta a 7-napos, de csökkentette a 35 napos CAFC frekvenciát, alacsony koncentrációban viszont szignifikánsan növelte a 35. napon a „macskakő” kolóniát képző – azaz fiatal vérképző sejtek arányát. Amikor Lin⁻ csontvelői sejteket két hétig tenyésztettünk citokinek (SCF,

FL, TPO) és mono-, vagy multivalens sJG1^{ECD} egyidejű jelenlétében, kiderült, hogy a multivalens Notch ligandum hatására a kontrollokhoz képest mintegy 16-szorosára nőtt a 35 nap után CAFC kolóniát képző – azaz fiatal – hematopoetikus sejtek száma a kultúrákban. Sorozatos csontvelő transzplantációval azt is sikerült igazolnunk, hogy ilyenkor a tartós *in vivo* repopulációra képes HSC-k (LTRA sejtek) mennyisége (is) nőtt a tenyészetekben. Elmondhatjuk tehát, hogy a Jagged-1 fehérje hatása nagymértékben függ a prezentálás módjától (55. ábra), és a jelfogó sejt érési stádiumától. Az elkötelezett elődsejtek Notch receptorai szolubilis ligandum kötése során is aktiválódnak és a sejtek proliferációja fokozódik. A korai vérképző sejtek (HSC-k) viszont – kizárólag a multivalens forma és a megfelelő citokinek egyidejű jelenlétében - többszöri önfenntartó osztódásra is képesek. A multivalens Jagged-1 ligandum tehát elősegítette a HSC kompartment növekedését anélkül, hogy közben romlott volna az őssejtek „minősége”, azaz *in vivo* repopulációs képessége. Eredményeinket, miszerint a Notch aktivitás gátolja a vérképző őssejtek differenciálódását, és ezzel *in vivo* is elősegíti a HSC kompartment fenntartását, azóta több munkacsoport megerősítette (Duncan AW et al, 2005; Wu M et al, 2007; Weber JM and Calvi LM, 2010). Szintén számos megfigyelés igazolja, hogy a vérképző őssejt „niche”-t alkotó sejtek – osteoblastok, endothel és CAR sejtek - valóban nagy mennyiségű Notch ligandumot, elsősorban Jagged-1-et expresszálnak (Karanu FN et al, 2000; Weber JM et al, 2006; Sacchetti B et al, 2007). Mint a bevezetőben részletesen kifejtettük (ld: 1.3.1.-ben), az utóbbi években - különböző, kondicionált „knock out” egereken végzett vizsgálatok alapján - többen kétségbe vonták a Notch rendszer szerepét a vérképzés szabályozásában (Mancini SJ et al, 2005; Maillard I, et al, 2008). Megjegyzendő, hogy ennek ellentmondó eredmények is születtek (Kim YW et al, 2008). A jelenleg leginkább elfogadott hipotézis szerint a Notch jeltovábbító rendszer a korai hematovaskulogenezisben és az első definitív HSC-k kialakulásában (Clements WK et al, 2012; Laranjeiro R et al, 2012), valamint a csontvelő károsodását (besugárzást, mérgezést) követő regenerációban játszik meghatározó szerepet. Működésére tehát főként akkor van szükség, amikor az őssejt populációnak - elsősorban szimmetrikus, önfenntartó osztódások révén – növekednie kell (Weber JM and Calvi LM, 2010). Ez azonban nem zárja ki, hogy a Notch-nak az egyensúlyi (fiziológiás) vérképzés szabályozásában is van valamilyen szerepe. Itt hivatkoznánk Kim és mtsainak arra a megfigyelésére, miszerint a Midbomb-1 - a Notch ligandumok endocitózisához és a receptorok aktivitásához szükséges szabályozó fehérje – génjének kiütése súlyos myeloproliferatív betegséget okoz az egerekben (Kim

YW et al, 2008), illetve utalnánk a saját, myelodysplasiás (MDS) betegek vérképző és stroma sejtjeinek vizsgálata során kapott eredményeinkre (ld: 4.4.1.2.-ben).



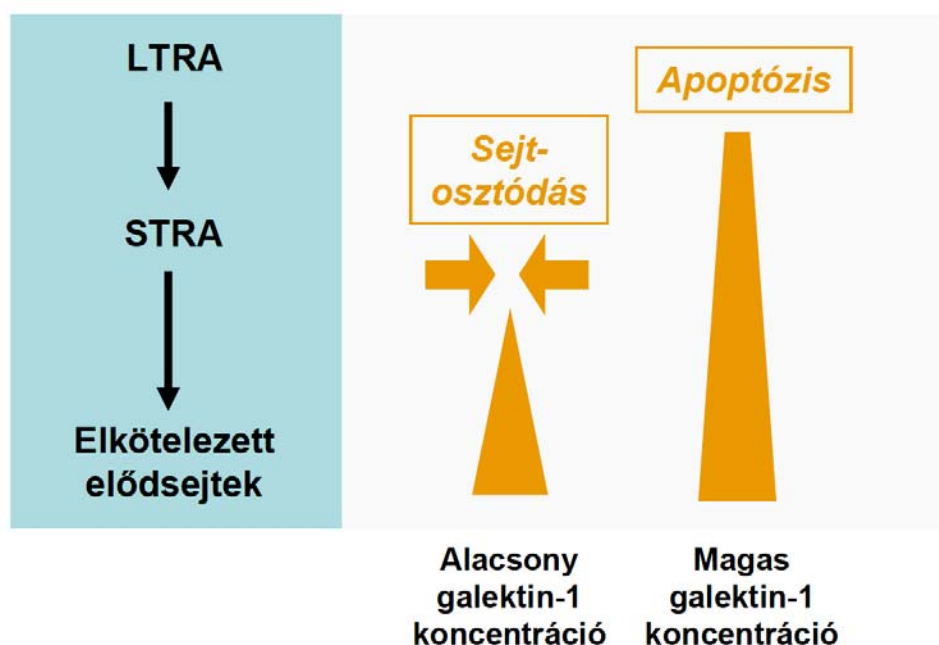
55. ábra. **A Jagged-1 fehérje feltételezett hatásmechanizmusa tenyészteteinkben.** Az *in vitro* kis mennyiségben adott sJG1^{ECD} képes kötődni a stroma réteg extracelluláris mátrixához. Az ilyen módon immobilizált Jagged-1 is hatékonyan indukál önfenntartó osztódást az őssejtekben. Nagy mennyiségben a sJG1^{ECD} viszont képes blokkolni a Notch receptorokat (A). Az *in vitro* expansziós kultúrában az sJG1^{ECD}-vel fedett gyöngyök sokkal erősebb multivalens Notch ligandumnak bizonyultak, mint a stroma sejtek felszínén bemutatott forma, de a sJG1^{ECD} ebben az esetben is képes volt gátolni a Notch jelzést a vérképző őssejtekben (B).

A myelodysplasiás szindróma (MDS) hátterében a csontvelői őssejtek defektusa következtében, leggyakrabban idős korban (70-80 év) kialakuló, klonális megbetegedések heterogén csoportja áll. Jellemzője az inefektív vérképzés: normális vagy fokozott cellularitású csontvelő ellenére a vérben egy vagy több sejtfejlődési sort (vörösvérsejt, granulocyta-macrophag és/vagy thrombocyta) érintő cytopenia észlelhető. A betegek közel

felében idővel akut (elsősorban myeloid, ritkán lymphoid) leukaemia alakul ki (Steensma DP and Tefferi A, 2003; Nimer SD, 2008). Az MDS érdekessége, hogy a betegség – bár kétségtelenül egy vérképző klónból indul ki - minden jel szerint a csontvelői stromát is érinti. A stromaállományban megnövekszik az apoptotikus sejtek és a róluk lefűződő fragmentumok, valamint az ezeket bekebelező fagocitasejtek aránya (Shetty V et al, 2002). Emelkedik a gyulladásos citokinek, elsősorban a TNF- α termelése (Tennant GB et al, 2000), ami valószínűleg hozzájárul a vérképző sejtek fokozott pusztulásához (Raaijmakers MH, 2012). Flores-Figueroa és mtsai (Flores-Figueroa E et al, 2005) pedig számos kromoszóma rendellenességet is találtak az MDS-es betegek stromájában. Saját mintáink vizsgálata során megállapítottuk, hogy az MDS betegek csontvelői mononukleáris sejtjei (MNC) lágy gélben kevesebb hematopoetikus kolóniát képeznek, mint a kontroll mintákból izolált MNC-k. A kóros csontvelő MSC-i lassabban növekednek, hamarabb szeneszccenssé válnak és kevésbé plasztikusak, mint az egészséges kontroll sejtek. Ráadásul vérképzést támogató képességük is jelentősen csökkent. Mindezek alapján feltételeztük, hogy a mikrokörnyezet – a vérképző őssejt „niche” – károsodása is felelős az MDS kialakulásáért, amit később több munkacsoport is megerősített (Aanei CM et al, 2012; Flores-Figueroa E et al, 2012). Ami viszont a Notch rendszer működését illeti, ha MDS beteg MNC-it egészséges, vagy MDS stromán inkubáltuk („macskakő” kultúra), az sJG1^{ECD} magas koncentrációban (5 μ g/ml) sem gátolta a 35-42 napos CAFC kolóniák kialakulását. MDS betegekben tehát a Notch rendszer működése is zavart szenved, ami meglepő párhuzamot mutat Kim és mtsai fent már említett (Midbomb-1 „knock out” egér) eredményeivel (Kim YW et al, 2008). A Notch jeltovábbító rendszer tehát valószínűleg a normális, egyensúlyi vérképzés szabályozásában is szerepet játszik, ami MDS-ben kórossá válik és legalábbis részben felelős a kórkép kialakításáért.

A következő mediátor, aminek a hematopoézis szabályozásában és a vérképző sejtek mobilizációjában betöltött szerepét vizsgáltuk a galektin-1 (Gal-1), egy kis molekulatömegű (14 kDa), szolubilis lektin volt (Barondes SH et al, 1994; Yang RY et al, 2008). Azért ezt a közismerten immunszuppresszív és gyulladásgátló (Cooper D et al, 2010) anyagot választottuk, mert az MSC-kben az egyik legnagyobb mennyiségben kifejeződő fehérje a Gal-1 (Silva WA et al, 2003; Kadri T et al, 2005). A rekombináns Gal-1, koncentrációjától függően bifázisosan hat a vérképző ősz- és elődsejtek növekedésére (ld: 4.4.1.3.-ban). Alacsony koncentrációban (10-20 ng/ml) növeli a lágy gélben, illetve 7 napos „macskakő” kultúrában kolóniát képző sejtek gyakoriságát. Magas koncentrációban

(5-10 $\mu\text{g/ml}$) viszont mind az elkötelezett elődsejtek (BFU-E és CFU-GM), mind a fiatalabb (28-35 napos CAFC) vértképző sejtek kolóniaképzését gátolja. Utóbbi nem egyszerűen a sejtosztódás gátlását jelenti, hanem – legalábbis részben – direkt sejtpusztulást eredményez. A Gal-1 magas koncentrációban tehát apoptózist indukál, aminek mértéke összefügg a sejtek érési stádiumával. Az elkötelezett myeloid és erythroid elődsejtek a legérzékenyebbek a Gal-1 indukált apoptózisra, míg a fiatalabb – 28 és 35 nap után CAFC kolóniát képző sejtek - ellenállóbbak a lektinnel szemben (56. ábra). Ez összhangban van azokkal a korábbi megfigyelésekkel, miszerint a Gal-1 más sejtek proliferációját is hasonló - bifázisos - módon befolyásolja *in vitro* kultúrában (Adams L, et al, 1996), illetve különböző sejtekben – például T lymphocytákban – apoptózist indukál (Perillo NL et al, 1995, Fajka-Boja R et al, 2002).



56. ábra. A rekombináns galektin-1 hatása a vértképző ő- és elődsejtek osztódására és pusztulására

A hematopoetikus ő- és elődsejtek egy része fiziológias körülmények között is folyamatosan kilép a csontvelőből és eljut a különböző szövetekbe, majd – rövid idő után - visszatér a vértképző „niche”-be. Ezeknek az „örjáratozó” (recirkuláló) sejteknek a száma gyulladás, vagy fertőzés következtében jelentősen megnő, és egy részük megtapad az érintett szervekben, ahol érett myeloid – elsősorban DC és fagocita - sejtekké differenciálódik (Mazo IB et al, 2011; Schroeder MA and DiPersio JF, 2012). Figyelembe

vége a Gal-1 gyulladásgátló aktivitását, megvizsgáltuk, hogy képes-e ennek a folyamatnak a gátlására. Nagyszámú HSC és elkötelezett elődsejt egyidejű mobilizációját cicklofoszfamid (Cy) és granulocita kolónia-stimuláló faktor (G-CSF) segítségével idéztük elő (Molineux G t al, 1990). Az intravénásan adott Gal-1 dózis- és időfüggő módon gátolta a folyamatot. A csökkent mobilizáció ellenére az Sca-1⁺, Gr-1⁺ és CD11b⁺ sejtek gyakorisága és abszolút száma jelentősen magasabbnak bizonyult a Cy-dal, G-CSF-fel és Gal-1-el kezelt egerek csontvelő mintáiban, mint a csak Cy és G-CSF kezelt állatokéban. Ráadásul, bár a csontvelői magvas sejtek számát a Gal-1 önmagában nem befolyásolta, a mobilizáció hatására enyhén megnőtt a CFU-GM gyakoriság a csontvelőben, függetlenül attól, hogy kapott-e az állat Gal-1-et is a Cy-al kombinált G-CSF kezelés alatt. A Gal-1 tehát a mobilizáció során nem gátolta, inkább stimulálta a vérképző elődsejtek osztódását és felszaporodását a csontvelőben. Ez összhangban van az előző bekezdésben már említett megfigyelésünkkel, miszerint a Gal-1 alacsony koncentrációban fokozza a granulocita-macrophag és az erythroid progenitorok proliferációját *in vitro* kultúrában.

A Gal-1 *in vivo* hatásmechanizmusának vizsgálatokor kizártuk, hogy a lektin a mobilizáció egyik korai kulcslépését (Heissig B et al, 2002), a matrix metalloproteázok aktiválódását gátolná. Ugyanakkor megállapítottuk, hogy (i) a Gal-1 gátolja a vérképző elődsejtek CXCL12 (SDF-1) indukált transzendotheliális migrációját *in vitro*, (ii) ellentétes hatással van a csontvelő és a vér cellularitására a Cy-dal kombinált G-CSF kezelés alatt *in vivo*, (iii) csak a mobilizáció második szakaszában – amikor a sejtek transzendotheliális migrációja történik - van feltétlenül szükség a lektin jelenlétére a gátlás kialakulásához. A Gal-1 tehát a vérképző ős- és elődsejteknek az érfalakon történő átjutását akadályozza. Ezzel egybehangzó eredményeket kaptak, amikor a neutrofil granulocyták hasüregbe történő - IL-1 β indukált - beáramlását (La M et al, 2003), illetve a T lymphocyták érfalakon történő átlépését (He J and Baum LG, 2006) tanulmányozták. A Gal-1 gyulladásgátló aktivitása tehát – legalábbis részben – a leukocyták transzendotheliális migrációjának gátlásán alapul.

5.3. Immunszuppresszió és gyulladásgátlás

Mint a bevezetőben már részletesen kifejtettük (ld: 1.5.-ben), az MSC-k egyik legmeglepőbb és terápiás szempontból legígéretesebb sajátossága a mind *in vitro* kultúrákban, mind *in vivo* kísérleti rendszerekben megnyilvánuló erőteljes immunszuppresszív és gyulladásgátló aktivitás (Shi Y et al, 2010). Az általunk különböző szervekből izolált stroma sejtek közül a csontvelői, zsírszövet és lép eredetű MSC-k

gyakorlatilag azonos mértékben képesek gátolni a T lymphocyták proliferációját *in vitro* kultúrában (ld: 4.4.2.2.-ben). Az aorta fal eredetű MSC-k gátló aktivitása mérsékeltebb, míg a thymus eredetű sejtek sem a mitogén (ConA), sem az alloantigén (MLR) indukált T-sejt osztódást nem befolyásolják (hasonló jelenséget tapasztaltunk *in vivo* is, ld: az 5.4.-ben). A Cs- és Zs-MSK-knek a T lymphocyták osztódására gyakorolt negatív hatását a ciklooxygenáz enzimeket gátló indometacin (Indo), valamint a nitrogén-oxid-szintáz gátló N-metil-L-arginin-acetát (L-NMA) – a korábbi irodalmi adatokkal egybehangzóan (Aggarwal S and Pittenger MF, 2005; Chen K et al, 2010; Yañez R et al, 2010) - részben képes feloldani, együttes alkalmazásukkor azonban a két enzimgátló hatása nem additív. A T-sejt proliferáció MSC-k általi gátlásában tehát a prosztaglandin(ok)nak és a nitrogén-oxidnak (NO) is szerepe van. Különösen a prosztaglandin E2 (PGE2) az a lipid mediátor, aminek mind *in vitro* (Aggarwal S and Pittenger MF, 2005), mind *in vivo* (Németh K et al, 2009; Esaki Y et al, 2010) meghatározó szerepet tulajdonítanak az MSC-k immunszuppresszív és gyulladásgátló aktivitásában.

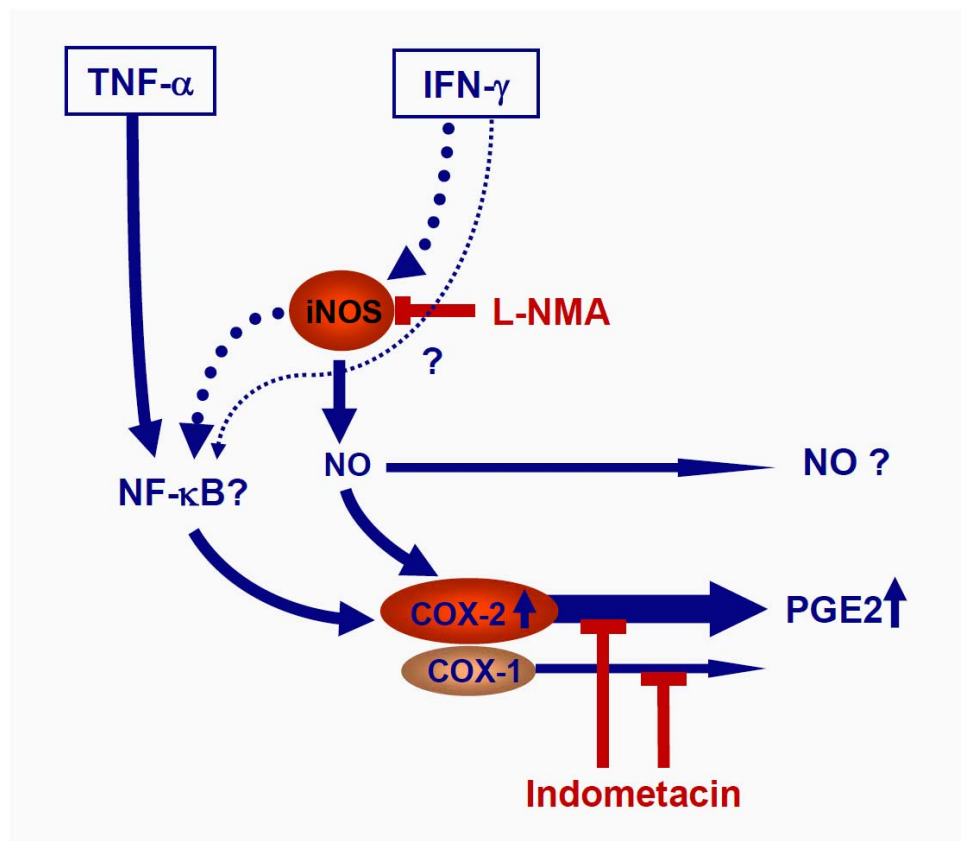
Az MSC-k PGE2 termelésének szabályozásával kapcsolatban azonban részben ellentmondó eredmények születtek. Egyes szerzők a közvetlen T-sejt – MSC kölcsönhatás fontosságát (Sheng H et al, 2008), mások különböző citokinek szerepét (Yang SH et al 2009; Chen K et al 2010) hangsúlyozzák a folyamatban. Az MSC-kben – sok más sejthez hasonlóan - az arachidonsav PGE2-vé alakulását a ciklooxygenáz enzim két izoformája (COX-1 és COX-2, PGH szintáz-1 és -2) katalizálja. Fiziológias körülmények között a PGE2 termelést a konstitutíven expresszáldó COX-1 biztosítja, gyulladásos környezetben azonban ugrásszerűen megnő az indukálható COX-2 expressziója, ami a PGE2 termelés fokozódásához vezet (Murakami M and Kudo I, 2004). Sikertült igazolnunk (ld: 4.4.2.2.-ben), hogy az egér Cstv- és Zs-MSK-k PGE2 szekréciója aktivált T-sejtek, és/vagy gyulladásos citokinek megfelelő kombinációjának jelenlétében valóban erőteljesen emelkedik. A mitogénnel (ConA) aktivált T lymphocytákkal együtt tenyésztett MSC-k fokozott PGE2 termelése azonban megszűnik, ha a sejteket félig áteresztő hártyával választjuk el egymástól. Ráadásul az aktivált T-sejtek által indukált PGE2 termelés indometacinnal gátlható, L-NMA-val viszont nem. Ez, mások megfigyeléseivel (Duffy MM et al, 2011) együtt arra utal, hogy az MSC-k aktivált T-sejtek által indukált fokozott PGE2 termelésében kulcsszerepe van a közvetlen sejt-sejt kontaktusnak, de a NO-nak nincs jelentősége. Ez természetesen nem zárja ki azt, hogy más kísérleti körülmények között az MSC-k immunszuppresszív aktivitásában a NO is szerepet kaphat, ahogy ezt többen leírták (Sato K et al, 2007; Ren G et al 2008). A közvetlen MSC – T-sejt

kölcsönhatásban érintett, a COX-2 fokozott kifejeződéséért felelős szignált, vagy szignálokat nem vizsgáltuk, de a - mások (Sheng H et al, 2008) által javasolt - B7-H1 (PDL1) és B7-H4 molekulák fontos jeltovábbítók lehetnek ebben a kísérleti rendszerben.

Azt is megállapítottuk, hogy a TNF- α dózisfüggően képes PGE2 termelést indukálni az MSC-kben. Ezt a hatását az IFN- γ , ami önmagában nem váltott ki PGE2 szekréciót, erősen fokozta. Hasonló szinergizmust a TNF- α és az IFN- γ között számos más rendszerben is leírtak, például a RANTES specifikus mRNS termelés (Croitoru-Lamoury J et al, 2003), a CXCL10 szekréció (Clarke DL et al, 2010), és az intracelluláris adhéziónak molekulák expressziója (Ren G et al, 2010) során. Chen és mtsai (Chen K et al, 2010) az emberi MSC-k PGE2 termelésének és immunszuppresszív aktivitásának egyidejű fokozódását tapasztalták, amikor a sejteket IFN- γ és valamilyen más, gyulladásos citokin (TNF- α , IL-1 α , vagy IL-1 β) egyidejű jelenlétében tenyésztették. A TNF- α indukált PGE2 szekréció L-NMA-val nem gátolható, a két citokin által együttesen kiváltott PGE2 termelés viszont – legalábbis részlegesen – igen. Az IFN- γ PGE2 szekréciót fokozó hatása tehát részben NO függő. Tekintettel a kultúra felülszókban mérhető igen alacsony nitrit koncentrációra, adataink arra utalnak, hogy a NO, ez a rendkívül labilis oxidatív mediátor intracellulárisan, vagy legalábbis az őt termelő MSC közvetlen környezetében hat, valószínűleg úgy, ahogy ezt az 57. ábra mutatja. Természetesen felmerül a kérdés, hogy miért van szükség közvetlen sejt-sejt kölcsönhatásra ahhoz, hogy jelentős PGE2 termelést mérhessünk, amikor az MSC-ket aktivált T-sejtekkel együtt tenyésztjük. Lehetséges, hogy amikor citokineket adunk a kultúrákhoz, akkor a COX-2 az MSC-kben gyorsan aktiválódik, míg az MSC - T-sejt kétirányú kölcsönhatás során bonyolultabb és időigényesebb folyamatok játszódnak le. A másik lehetőség, hogy a T lymphocyták túl kevés citokint termelnek a kokultúrákban ahhoz, hogy további – a sejt-sejt kontaktuson alapuló – szignál(ok) nélkül is képesek legyenek fokozott PGE2 termelést kiváltani. Összefoglalásként tehát elmondhatjuk, hogy az egér C57BL/6 és Zs-MSC-k, aktivált T-sejtek, vagy gyulladásos citokinek jelenlétében nagy mennyiségű, potenciálisan immunszuppresszív mediátort, PGE2-t termelnek. Az MSC-k PGE2 termelése azonban több, részben átfedő jeltovábbító úton át is kiváltható.

Az MSC-k által termelt PGE2 jelentőségét többek között az adja, hogy ez lehet az őssejtek és a mononukleáris fagocitasejtek közti kölcsönhatás(ok) során felszabaduló egyik legfontosabb szolubilis mediátor. Saját, jelenleg folyó kutatásaink (ld: 4.4.2.3.-ban) és néhány, a közelmúltban megjelent publikáció (Maggini J et al, 2010; Cutler AJ et al, 2010;

Hof-Nahor I et al, 2012) arra utal, hogy részben a PGE2 felelős a fagocitasejtek MSC – macrophag (MΦ) kölcsönhatás során bekövetkező M2 irányú polarizációjáért. Az M2-es MΦ-ok pedig nélkülözhetelenek a gyulladásos folyamatok fékmentartása, a sebgyógyulás és a szövetregeneráció során (Murray PJ and Wynn TA, 2011; Sica A and Mantovani A, 2012).



57. ábra. A mesenchymalis őssejtek gyulladásokeltő citokinek által indukált prosztaglandin E2 szintézisének szabályozása

5.4. A diabetes mellitus egy lehetséges összejtterápiája

Az 1-es és a 2-es típusú diabetes mellitusos esetek száma világszerte gyorsan növekszik (Lam DW and LeRoith D, 2012). Mióta többféle rekombináns inzulin is a rendelkezésünkre áll, még a β -sejtek gyors és teljes pusztulásával járó, autoimmun eredetű 1-es típusú cukorbetegség is jól kezelhető. Ez azonban nem egyenlő a gyógyulással, hiszen a legkorszerűbb és leggondosabb kezelés mellett is fenyegetnek - ritkán az akut, de főleg - a krónikus szövődmények. A kívülről adagolt inzulin nem képes annyira pontosan követni a szervezet percről percre változó igényeit, mint ahogy azt az egészséges emberek β -sejtjei teszik fiziológias körülmények között. Igazi, kuratív terápia az lenne, ha egyidejűleg sikerülne (i) pótolni a beteg elveszett β -sejtjeit, és (ii) megállítani a sejtpusztulást okozó autoimmun folyamatot (1-es típusú DM esetén), illetve (iii) feloldani a szövetek inzulin rezisztenciáját (2-es típusú DM esetén) (Bluestone JA et al, 2010). Ezért kíséri világszerte rendkívüli figyelem a diabetes mellitus gyógyítására irányuló új, őssejtek felhasználásán alapuló terápiás eljárások kidolgozását (Aguayo-Mazzucato C et al, 2010).

Laboratóriumunkban mi is egy ilyen – a cukorbetegség gyógyítására alkalmas – őssejtterápiás eljárást, illetve annak preklinikai modelljét dolgoztuk ki. Kísérleteinket nőstény C57Bl/6-os egereken végeztük, amelyekben kis dóziszú STZ ismételt adásával idéztük elő a betegséget (Like AA and Rossini AA, 1976). A mérég szelektíven elpusztította a hasnyálmirigy szigetek inzulin-termelő β -sejtjeit, amit a vércukorszint értékek gyors emelkedése, a szérum inzulinszintek csökkenése, és a szövettani vizsgálatok egyértelműen igazoltak (ld: 4.4.3.1.-ben). Az állatokat az STZ kezelés megkezdése után 15 nappal, amikor vércukorszintjük két egymást követő napon is meghaladta a 10 mmol/l értéket, friss csontvelő grafftal oltottuk. A korábbi irodalmi adatokkal (Ianus A et al, 2003; Banerjee M et al, 2005) ellentétben azonban a BMT (10^6 BMC/egér) csak átmenetileg lassította a betegség progresszióját és azt is csak szubletális (250-450 cGy) besugárzás után. Letális (900 cGy) TBI-t követően az STZ-vel kezelt egerek a transzplantáció ellenére elpusztultak. (A mérég és az erős sugárzás együttes hatása tehát már elviselhetelen volt az állatok számára). Amikor viszont szubletális (250 cGy) TBI után egyidejűleg 10^6 BMC-t és 10^5 , előzőleg *in vitro* kultúrában tenyésztett szingén, szemiallogén, vagy allogén MSC-t adtunk intravénásan a cukorbeteg egereknek, kísérleti állataink meggyógyultak. Vércukor és szérum inzulin szintjük 6-8 hét alatt normalizálódott. Hasnyálmirigyükben a Langerhans-szigetek száma és mérete megközelítette az egészséges pancreasban

találhatókét. Immunhisztokémiai vizsgálatok szerint ezek a szigetek megteltek működőképes, inzulin-termelő β -sejtekkel. A gyógyult állatok glükóz tolerancia teszt eredményei a kezeletlen kontroll állatokéval azonosak voltak. Kísérleti rendszerünkben az MSC-knek önmagukban – friss csontvelői magvas sejtek egyidejű adása nélkül - nem volt hatásuk a betegség lefolyására. Annak ellenére sem, hogy több munkacsoport szerint az MSC-k egyedül is képesek lassítani a diabetes progresszióját (Lee RH et al 2006; Madec AM et al, 2009; Jurewicz M et al, 2010; Bassi EJ et al, 2012; Bell GI et al, 2012a, b). Ezeket a kísérleteket azonban - kivétel nélkül - egészen más genetikai hátterű, autoimmun és immundeficiens, NOD, vagy NOD/scid egereken végezték. Ráadásul a kezelések során alkalmazott sejtszámok is jelentősen eltérnek egymástól, $50\text{--}150 \times 10^6$ MSC/testsúly kg, szemben az általunk alkalmazott – egy preklinikai modellben gondolkodva jóval realisabbnak ítélt - 5×10^6 MSC/testsúly kg dózissal. Mindkét tényező, vagy esetleg a kettő együtt magyarázhatja az eltérő eredményeket. Hozzá kell tennünk azt is, hogy nem minden MSC bizonyult hatékonynak modellünkben. A thymusból izolált MSC-k, BMC-kkel együtt adva sem voltak alkalmasak a diabetes gyógyítására, ami magyarázható a thymus eredetű MSC-k fent leírt eltérő immunszuppresszív sajátásaival.

Mivel a BMC-k és MSC-k kotranszplantációjával meggyógyított állatok regenerálódott hasnyálmirigyében sem Y kromoszómát hordozó, sem EGFP⁺, azaz donor eredetű, netán inzulinra is pozitív sejtet nem találtunk (ld: 4.4.3.2.-ben), egyértelmű, hogy a kezelés hatására megjelenő új β -sejtek recipiens eredetűek voltak. A transzplantáció során a cukorbeteg állatok szervezetébe juttatott ős- és elődsejtek tehát nem épültek be a pancreasba, és nem transzdifferentiálódtak β -sejtekké, ellentétben Ianus és mtsai korábbi elképzelésével (Ianus A et al, 2003). (Y kromoszóma pozitív sejtek csak a recipiensek csontvelőjében, de ott is csak átmenetileg voltak kimutathatók). Vagyis a sejtterápia kedvező hatása valószínűleg szolubilis faktorok közvetítésével, indirekt úton érvényesült. 2008-ban, amikor ezeket az eredményeinket publikáltuk (Urbán VS et al, 2008), irodalmi adatok alapján (Izumida Y et al, 2005) elsősorban a HGF, mint az endogén pancreas regenerációját elindító növekedési és differentiálódási faktor szerepe tűnt meghatározónak a folyamatban. Azóta kiderült, hogy a HGF mellett (Mellado-Gil J et al, 2011; Flaquer M et al, 2012) számos további - az őssejtek, elsősorban az MSC-k által termelt – szolubilis mediátor (IGF-1, PDGF és PGE2) együttes hatására van szükség a hasnyálmirigy regenerációja során (Agudo J et al, 2008; Chen H et al, 2011; Vennemann A et al, 2012). Ezek a faktorok részben a károsodott Langerhans szigetek oxigén- és

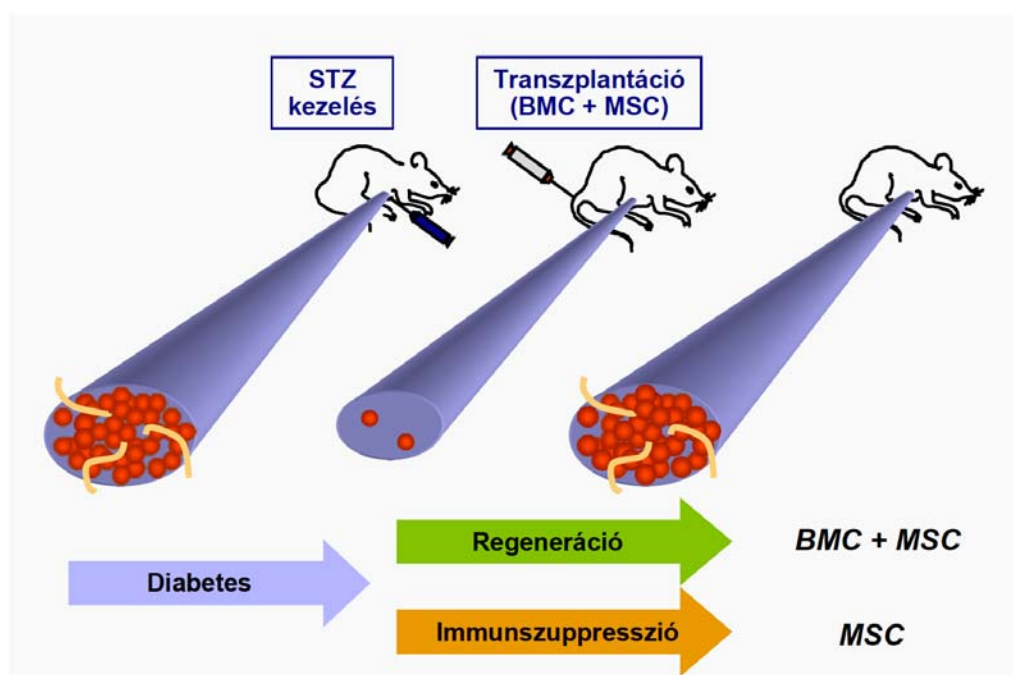
tápanyagellátásának javítása, új kapillárisok képződésének elindítása révén is segítik új β -sejtek képződését (Hess D et al, 2003; Bell GI et al, 2012a; 2012b), de az endothel sejteknek az organogenezis során a hasnyálmirigy kialakulásában játszott szerepe is közismert (Lammert E et al, 2003). A különböző – részben hematopoetikus (BMC), részben nem vérképző eredetű (MSC) sejtpopulációk, illetve szubpopulációk együttműködése biztosítja, hogy a számos mediátor megfelelő mennyiségben és arányban termelődjön a kezelés során. Ezt újabban Bell és mtsai is megerősítették (Bell GI et al, 2012a).

A következő kérdés az, hogy honnan erednek az összejt kezelés hatására megjelenő új β -sejtek. Mint a bevezetőben már részletesen leírtuk (ld: 1.6.-ban) az egyik forrás a még életképes – az STZ kezelést túlélte - β -sejtek osztódása lehet (Dor Y, 2006; Bonner-Weir S et al, 2010). Ugyanígy elképzelehető az inzulin-termelő sejtek „fakultatív összejtekből” - elsősorban ductalis epithel sejtekből, vagy esetleg acinus sejtekből – kiinduló neogenezise (Puri S and Hebrok M, 2010; Gianani R, 2011; Seymour PA and Sander M, 2011). Végül, bár létezésük vitatott, egy „hasnyálmirigy specifikus” összejtpopuláció létezése sem zárható ki teljesen (Yalniz M et al, 2005). A regeneráció során keletkező új β -sejtek eredete azonban – megfelelő kísérleti eredmények hiányában - további vizsgálatokat igényel.

Mivel az STZ-indukált gyors β -sejt pusztulás gyulladással, valamint a felszabaduló saját – pancreas, illetve β -sejt specifikus – antigének elleni autoimmun válasszal is jár (Like AA and Rossini AA, 1976; Paik SG et al, 1980), az inzulin-termelő sejtek az antibiotikum (STZ) adása után egy ideig még folyamatos veszélynek vannak kitéve. Kísérleti rendszerünkben az MSC-k jelentősen csökkentették ezt a β -sejt specifikus autoimmun T-sejt válasz (ld: 4.4.3.3.-ban). Azoknak a cukorbeteg állatoknak a pancreasából, amelyeket BMC-kkel és MSC-kkel kezeltünk, hiányoznak a pancreas-specifikus autoantigén(ek) jelenlétében *in vitro* kultúrában osztódó T-sejtek. A kizárólag BMC-kkel oltott cukorbeteg állatok hasnyálmirigyében viszont kifejezetten nőtt az autoreaktív T sejtek aktivitása a nem transzplantált, de STZ-vel kezelt egerekéhez képest. (Ennek oka az lehet, hogy a BMC transzplantáció némileg lassította a betegség progresszióját, kedvezőbb lehetőséget teremtve az autoimmun válasz kialakulásához és éréséhez). A csak MSC-kkel oltott állatokban az autoantigén specifikus T lymphocytá válassz gátolt ugyan, de pancreas regeneráció nem történt. Meg kell jegyezni, hogy az MSC-k immunuszuppresszív gyógyszer, Cyclosporin A (CsA) adásával nem helyettesíthetők modellünkben. A gyógyszer immunuszuppresszív hatása érvényesül, de hasnyálmirigy

regeneráció BMC-k egyidejű adása esetén sem következik be. Ez is azt igazolja, hogy az MSC-k a BMC-kkel együtt részt vesznek magában a regenerációs folyamatban is. E mellett természetesen nem hagyhatjuk figyelmen kívül a CsA mellékehatásait – például nephro- és hepatotoxicitását – ami szintén nem kedvez a szövetregenerációnak (Rezzani R, 2004).

A közelmúltban publikált eredmények szerint az MSC-k számos lényeges változást indukálnak az 1-es típusú DM-ben szenvedő – NOD és NOD/scid - állatok immunrendszerében *in vivo*. Többek között megváltoztatják a Th sejtek arányát a Th2-es lymphocyták javára (Bassi EJ et al, 2012; Ezquer F et al, 2012), csökkentik a sejtek IFN- γ termelését és növelik a TGF- β szekrécióját (Fiorina P et al, 2009; Montane J et al, 2011). Gátolják a DC-k érését (Jurewicz M et al, 2010), ugyanakkor segítik a Treg sejtek keletkezését, vagy legalábbis érését és proliferációját (Madec AM et al, 2009; Montane J et al, 2011). Nagy valószínűséggel az STZ-indukált DM esetében is hasonló *in vivo* változások történhetnek az MSC-kezelés hatására.



58. ábra. A streptozotocin indukált diabetes őssejtterápiájának feltételezett mechanizmusa

Elmondhatjuk tehát, hogy laboratóriumunkban sikerült kidolgozni egy, az 1-es típusú DM gyógyítására alkalmas preklinikai állatmodellt, amelyben szingén csontvelő graft (10^6 BMC/állat iv.) és szingén, szemiallogén vagy allogén mesenchymális őssejtek (10^5 MSC/állat iv.) egyidejű adásával az STZ indukálta diabetes gyógyítható. A terápia csak minimális, csontvelő halált nem okozó (250 cGy TBI) előkészítő kezelést igényel.

A transzplantált ős- és elődsejtek közvetett úton, valószínűleg szolubilis mediátorok révén fejtik ki terápiás hatásukat, azaz egy endogén regenerációs folyamatot indítanak el a hasnyálmirigyben. Ők maguk nem transzdifferentiálódnak β -sejtekké. A beteg állatok gyógyulása két párhuzamos, egymást kiegészítő folyamat eredménye. Az *in vitro* kultúrában felszaporított MSC-k – a többi csontvelői magvas sejttel (BMC) együttműködve biztosítják a Langerhans-szigetek regenerációját. Ugyanakkor, immunszuppresszív hatásuk révén – megakadályozzák a β -sejt specifikus autoreaktív T-sejt választ, lehetővé téve ezzel az újonnan keletkezett inzulin-termelő sejtek túlélését, azaz a regenerációs folyamat sikerét (58. ábra).

Eredményeink számos további – a gyógyulás pontos mechanizmusára vonatkozó - kérdést is felvetnek. Tisztázandók még a kétféle graft együttműködésének részletei. A vérképző sejtek melyik populációja, illetve szubpopulációja lép valójában kölcsönhatásba az MSC-kkel? Milyen faktorokat termelnek ezek a sejtek és milyeneket az MSC-k? Mi az a különbség a thymus eredetű és az összes többi általunk vizsgált MSC populáció között, amiért a Th-MSK-k – legalábbis ebben a modellrendszerben - nem alkalmasak terápiás célra? Milyen faktorokat termelnek a BMC-k és milyeneket az MSC-k? Milyen jelátviteli mechanizmusokon keresztül és milyen sejtekre hatnak ezek a faktorok? Milyen sejtípusból indul ki az endokrin pancreas regenerációja?

6. Összefoglalás

- A különböző szervekben (csontvelő, zsírszövet, thymus, lép, és aorta fal) található mesenchymalis ősz-, vagy stroma sejt (MSC) populációk az ontogenezis során a mesoderma szegmentálódását (a somiták kialakulását?) követően jönnek létre, az egyes testszervekben külön-külön meginduló, de párhuzamos fejlődési folyamat eredményeként.
- Ezek a sejtpopulációk határozott pozicionális memóriával rendelkeznek, mivel – részben eltérő - génexpressziós profiljuk egyértelműen tükrözi a sejtek eredeti (*in situ*) anatómiai lokalizációját.
- Az elkötelezett vérképző elődsejtek számára a csontvelői stroma sejtek felszínén nagy mennyiségben kifejeződő Notch ligandum, a Jagged-1 mind mono (sJG1^{ECD})-mind multivalens (Sepharose-4B gyöngyök felszínén inszolubilizált sJG1^{ECD}) formában növekedési kofaktor.
- A tartós *in vivo* repopulációra képes vérképző őssejtek (LTRA HSC) multivalens Jagged-1 ligandum (Sepharose-4B gyöngyök felszínén inszolubilizált sJG1^{ECD}) és megfelelő citokinek (SCF, Flt3L és TPO) egyidejű jelenlétében *in vitro* kultúrában is többszöri, önfenntartó osztódásra készíthetők.
- Myelodysplasiás betegekben a Notch jeltovábbító rendszer működése zavart szenved, ami – többek között - e jelútnak a fiziológiás vérképzésben betöltött meghatározó szerepére (is) utalhat.
- A galektin-1-nek bifázisos hatása van a vérképző elődsejtek (BFU-E és CFU-GM, 7 napos CAFC) növekedésére. Ráadásul - magas koncentrációban - a lektin apoptózist (is) indukál a vérképző rendszerben, amire a legfiatalabb – 28 és 35 nap után CAFC kolóniát képző – hematopoetikus sejtek a legkevésbé, míg a legérettebb, myeloid és az erythroid elődsejtek a leginkább érzékenyek.
- A galektin-1 *in vivo* gyulladásgátló aktivitása – legalábbis részben – a leukocyták transzendotheliális migrációjának gátlásán alapul.
- A csontvelői és a zsírszövet eredetű egér MSC-k aktivált T-sejtek, vagy gyulladásoos citokinek jelenlétében nagy mennyiségű, potenciálisan immunszuppresszív mediátort, PGE2-t termelnek. Az MSC-k PGE2 termelése azonban több, részben átfedő jeltovábbító úton át is kiváltható.

- Az immunválaszban résztvevő sejtek és MSC-k közti kölcsönhatás(ok) mind az MSC-k, mind az immunsejtek funkcióját befolyásolják a szövetekben, így az őssejt-kezelés(ek) eredményét is jelentősen módosít(hat)ják. Az MSC-k az immunválasz korai szakaszában valószínűleg segítik a pathogének eliminációját, ugyanakkor gátolják a túl erős - a szervezet integritását veszélyeztető - gyulladás kialakulását, és később biztosítják az érintett (sérült) szövet(ek) regenerációját.
- Sikerült kidolgoznunk egy, az 1-es típusú DM gyógyítására alkalmas preklinikai állatmodellt, amelyben szingén csontvelő graft és szingén, szemiallogén vagy allogén mesenchymális őssejtek egyidejű adásával az STZ indukálta diabetes gyógyítható. A terápia csak minimális, csontvelőhalált nem okozó előkészítő kezelést igényel.
- A transzplantált ős- és elődsejtek közvetett úton, valószínűleg szolubilis mediátorok révén fejtik ki terápiás hatásukat, azaz egy endogén regenerációs folyamatot indítanak el a hasnyálmirigyben. Ők maguk nem transzdifferentiálódnak β -sejtekké.
- A beteg állatok gyógyulása két párhuzamos, egymást kiegészítő folyamat eredménye. Az *in vitro* kultúrában felszaporított MSC-k – a többi csontvelői magvas sejttel együttműködve biztosítják a Langerhans-szigetek regenerációját. Ugyanakkor, immunszuppresszív hatásuk révén – megakadályozzák a β -sejt specifikus autoreaktív T-sejt választ, lehetővé téve ezzel az újonnan keletkezett inzulintermelő sejtek túlélését, azaz a regenerációs folyamat sikerét.

Irodalom

- Aanei CM**, Flandrin P, Zugun Eloae F, Carasevici E, Guyotat D, Wattel E, Campos L. Intrinsic growth deficiencies of mesenchymal stromal cells in myelodysplastic syndromes. *Stem Cells Dev.* 2012; **21**: 1604-16015.
- Ackema KB, Charité J.** Mesenchymal stem cells from different organs are characterized by distinct topographic Hox codes. *Stem Cells Dev.* 2008; **17**: 979-991.
- Adams L**, Scott GK, Weinberg CS. Biphasic modulation of cell growth by recombinant human galectin-1. *Biochim Biophys Acta.* 1996; **1312**: 137-144.
- Adolfsson J**, Månsson R, Buza-Vidas N, Hultquist A, Liuba K, Jensen CT, Bryder D, Yang L, Borge OJ, Thoren LA, Anderson K, Sitnicka E, Sasaki Y, Sigvardsson M, Jacobsen SE. Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythromegakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell.* 2005; **121**: 295-306.
- Agarwal P**, Wylie JN, Galceran J, Arkhitko O, Li C, Deng C, Grosschedl R, Bruneau BG. Tbx5 is essential for forelimb bud initiation following patterning of the limb field in the mouse embryo. *Development.* 2003; **130**: 623-633.
- Aggarwal S, Pittenger MF.** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood.* 2005; **105**: 1815-1822.
- Aguayo-Mazzucato C, Bonner-Weir S.** Stem cell therapy for type 1 diabetes mellitus. *Nat Rev Endocrinol.* 2010; **6**: 139-148.
- Agudo J**, Ayuso E, Jimenez V, Salavert A, Casellas A, Tafuro S, Haurigot V, Ruberte J, Segovia JC, Bueren J, Bosch F. IGF-I mediates regeneration of endocrine pancreas by increasing beta cell replication through cell cycle protein modulation in mice. *Diabetologia.* 2008; **51**: 1862-1872.
- Akiyama K**, Chen C, Wang D, Xu X, Qu C, Yamaza T, Cai T, Chen W, Sun L, Shi S. Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell.* 2012; **10**: 544-555.
- Albera C**, Polak JM, Janes S, Griffiths MJ, Alison MR, Wright NA, Navaratnasarah S, Poulson R, Jeffery R, Fisher C, Burke M, Bishop AE. Repopulation of human pulmonary epithelium by bone marrow cells: a potential means to promote repair. *Tissue Eng.* 2005; **11**: 1115-1121.
- Al-Nbaheen M**, Vishnubalaji R, Ali D, Bouslimi A, Al-Jassir F, Megges M, Prigione A, Adjaye J, Kassem M, Aldahmash A. Human Stromal (Mesenchymal) Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue and Skin Exhibit Differences in Molecular Phenotype and Differentiation Potential. *Stem Cell Rev.* 2012 Apr 14. [Epub ahead of print]
- Alvarez-Dolado M**, Pardal R, Garcia-Verdugo JM, Fike JR, Lee HO, Pfeffer K, Lois C, Morrison SJ, Alvarez-Buylla A. Fusion of bone-marrow-derived cells with Purkinje neurons, cardiomyocytes and hepatocytes. *Nature.* 2003; **425**: 968-973.
- Anderson DM**, Arredondo J, Hahn K, Valente G, Martin JF, Wilson-Rawls J, Rawls A. Mohawk is a novel homeobox gene expressed in the developing mouse embryo. *Dev Dyn.* 2006; **235**: 792-801.

- Anderson DM**, Beres BJ, Wilson-Rawls J, Rawls A. The homeobox gene *Mohawk* represses transcription by recruiting the sin3A/HDAC co-repressor complex. *Dev Dyn*. 2009; **238**: 572-580.
- Ando Z**, Sato S, Ikeda K, Kawakami K. Slc12a2 is a direct target of two closely related homeobox proteins, Six1 and Six4. *FEBS J*. 2005; **272**: 3026-3041.
- Anjos-Afonso F, Bonnet D**. Nonhematopoietic/endothelial SSEA-1+ cells define the most primitive progenitors in the adult murine bone marrow mesenchymal compartment. *Blood*. 2007; **109**: 1298-1306.
- Ankrum J, Karp JM**. Mesenchymal stem cell therapy: Two steps forward, one step back. *Trends Mol Med*. 2010; **16**: 203-209.
- Artavanis-Tsakonas S**, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science*. 1999; **284**: 770-776.
- Aslan H**, Zilberman Y, Kandel L, Liebergall M, Oskouian RJ, Gazit D, Gazit Z. Osteogenic differentiation of noncultured immunoisolated bone marrow-derived CD105+ cells. *Stem Cells*. 2006; **24**: 1728-1737.
- Augello A**, Tasso R, Negrini SM, Amateis A, Indiveri F, Cancedda R, Pennesi G. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur J Immunol*. 2005; **35**: 1482-1490.
- Augello A**, Tasso R, Negrini SM, Cancedda R, Pennesi G. Cell therapy using allogeneic bone marrow mesenchymal stem cells prevents tissue damage in collagen-induced arthritis. *Arthritis Rheum*. 2007; **56**: 1175-1186.
- Badri L**, Walker NM, Ohtsuka T, Wang Z, Delmar M, Flint A, Peters-Golden M, Toews GB, Pinsky DJ, Krebsbach PH, Lama VN. Epithelial interactions and local engraftment of lung-resident mesenchymal stem cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011; **45**: 809-816.
- Baeyens L, Bouwens L**. Can beta-cells be derived from exocrine pancreas? *Diabetes Obes Metab*. 2008; **10 Suppl 4**: 170-178.
- Baksh D**, Song L, Tuan RS. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med*. 2004; **8**: 301-316.
- Banerjee M**, Kumar A, Bhonde RR. Reversal of experimental diabetes by multiple bone marrow transplantation. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; **328**: 318-325.
- Barbash IM**, Chouraqui P, Baron J, Feinberg MS, Etzion S, Tessone A, Miller L, Guetta E, Zipori D, Kedes LH, Kloner RA, Leor J. Systemic delivery of bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the infarcted myocardium: feasibility, cell migration, and body distribution. *Circulation*. 2003; **108**: 863-868.
- Barondes SH**, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. *J Biol Chem*. 1994; **269**: 20807-20810.
- Bartholomew A, Sturgeon C, Siatskas M, Ferrer K, McIntosh K, Patil S, Hardy W, Devine S, Ucker D, Deans R, Moseley A, Hoffman R. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp Hematol*. 2002; **30**: 42-48.

- Bartosh TJ**, Ylöstalo JH, Mohammadipoor A, Bazhanov N, Coble K, Claypool K, Lee RH, Choi H, Prockop DJ. Aggregation of human mesenchymal stromal cells (MSCs) into 3D spheroids enhances their antiinflammatory properties. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; **107**: 13724-13729.
- Bassi EJ**, Moraes-Vieira PM, Moreira Sá CS, Almeida DC, Vieira LM, Cunha CS, Hiyane MI, Basso AS, Pacheco-Silva A, Câmara NO. Immune Regulatory Properties of Allogeneic Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells in the Treatment of Experimental Autoimmune Diabetes. *Diabetes*. 2012 Jun 11. [Epub ahead of print]
- Baum LG**, Blackall DP, Arias-Magallano S, Nanigian D, Uh SY, Browne JM, Hoffmann D, Emmanouilides CE, Territo MC, Baldwin GC. Amelioration of graft versus host disease by galectin-1. *Clin Immunol*. 2003; **109**: 295-307.
- Bell GI**, Meschino MT, Hughes-Large JM, Broughton HC, Xenocostas A, Hess DA. Combinatorial human progenitor cell transplantation optimizes islet regeneration through secretion of paracrine factors. *Stem Cells Dev*. 2012a; **21**: 1863-1876.
- Bell GI**, Putman DM, Hughes-Large JM, Hess DA. Intrapancreatic delivery of human umbilical cord blood aldehyde dehydrogenase-producing cells promotes islet regeneration. *Diabetologia*. 2012b; **55**: 1755-1760.
- Beltrami AP**, Cesselli D, Bergamin N, Marcon P, Rigo S, Puppato E, D'Aurizio F, Verardo R, Piazza S, Pignatelli A, Poz A, Baccarani U, Damiani D, Fanin R, Mariuzzi L, Finato N, Masolini P, Burelli S, Belluzzi O, Schneider C, Beltrami CA. Multipotent cells can be generated in vitro from several adult human organs (heart, liver, and bone marrow). *Blood*. 2007; **110**: 3438-3446.
- Ben-Ami E**, Berrih-Aknin S, Miller A. Mesenchymal stem cells as an immunomodulatory therapeutic strategy for autoimmune diseases. *Autoimmun Rev*. 2011; **10**: 410-415.
- Best M**, Carroll M, Hanley NA, Piper Hanley K. Embryonic stem cells to beta-cells by understanding pancreas development. *Mol Cell Endocrinol*. 2008; **288**: 86-94.
- Beverdam A**, **Meijlink F**. Expression patterns of group-I aristaless-related genes during craniofacial and limb development. *Mech Dev*. 2001; **107**: 163-167.
- Bianco P**, Robey PG, Simmons PJ. Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. 2008; **2**: 313-319.
- Bigas A**, **Espinosa L**. Hematopoietic stem cells: to be or Notch to be. *Blood*. 2012; **119**: 3226-3335.
- Blois SM**, Ilarregui JM, Tometten M, Garcia M, Orsal AS, Cordo-Russo R, Toscano MA, Bianco GA, Kobelt P, Handjiski B, Tirado I, Markert UR, Klapp BF, Poirier F, Szekeres-Bartho J, Rabinovich GA, Arck PC. A pivotal role for galectin-1 in fetomaternal tolerance. *Nat Med*. 2007; **13**: 1450-1457.
- Bluestone JA**, Herold K, Eisenbarth G. Genetics, pathogenesis and clinical interventions in type 1 diabetes. *Nature*. 2010; **464**: 1293-300.
- Bobacz K**, Gruber R, Soleiman A, Graninger WB, Luyten FP, Erlacher L. Cartilage-derived morphogenetic protein-1 and -2 are endogenously expressed in healthy and osteoarthritic human articular chondrocytes and stimulate matrix synthesis. *Osteoarthritis Cartilage*. 2002; **10**: 394-401.

Bonner-Weir S, Li WC, Ouziel-Yahalom L, Guo L, Weir GC, Sharma A. Beta-cell growth and regeneration: replication is only part of the story. *Diabetes*. 2010; **59**: 2340-2348.

Bouffi C, Bony C, Courties G, Jorgensen C, Noël D. IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One*. 2010; **5**: e14247.

Bouwens L. Beta cell regeneration. *Curr Diabetes Rev*. 2006; **2**: 3-9.

Bozyk PD, Popova AP, Bentley JK, Goldsmith AM, Linn MJ, Weiss DJ, Hersenson MB. Mesenchymal stromal cells from neonatal tracheal aspirates demonstrate a pattern of lung-specific gene expression. *Stem Cells Dev*. 2011; **20**: 1995-2007.

Brendolan A, Rosado MM, Carsetti R, Selleri L, Dear TN. Development and function of the mammalian spleen. *Bioessays*. 2007; **29**: 166-177.

Buckingham M, Relaix F. The role of Pax genes in the development of tissues and organs: Pax3 and Pax7 regulate muscle progenitor cell functions. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2007; **23**: 645-673.

Butler JM, Nolan DJ, Vertes EL, Varnum-Finney B, Kobayashi H, Hooper AT, Seandel M, Shido K, White IA, Kobayashi M, Witte L, May C, Shawber C, Kimura Y, Kitajewski J, Rosenwaks Z, Bernstein ID, Rafii S. Endothelial cells are essential for the self-renewal and repopulation of Notch-dependent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell*. 2010; **6**: 251-264.

Byrne P, Huang W, Wallace VM, Shean MK, Zhang Z, Zhong Q, Theodossiou C, Blakesley H, Kolls JK, Schwarzenberger P. Chimerism analysis in sex-mismatched murine transplantation using quantitative real-time PCR. *Biotechniques*. 2002; **32**: 279-380.

Calvi LM, Adams GB, Weibrecht KW, Weber JM, Olson DP, Knight MC, Martin RP, Schipani E, Divieti P, Bringham FR, Milner LA, Kronenberg HM, Scadden DT. Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature*. 2003; **425**: 841-846.

Caplan AI, Dennis JE. Mesenchymal stem cells as trophic mediators. *J Cell Biochem*. 2006; **98**: 1076-1084.

Caplan AI. Mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*. 1991; **9**: 641-650.

Carlesso N, Aster JC, Sklar J, Scadden DT. Notch1-induced delay of human hematopoietic progenitor cell differentiation is associated with altered cell cycle kinetics. *Blood*. 1999; **93**: 838-848.

Cedeno-Laurent F, Dimitroff CJ. Galectin-1 research in T cell immunity: past, present and future. *Clin Immunol*. 2012; **142**: 107-116.

cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003; **57**: 11-20.

Chamberlain G, Fox J, Ashton B, Middleton J. Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells*. 2007; **25**: 2739-2749.

- Chan J**, O'Donoghue K, Gavina M, Torrente Y, Kennea N, Mehmet H, Stewart H, Watt DJ, Morgan JE, Fisk NM. Galectin-1 induces skeletal muscle differentiation in human fetal mesenchymal stem cells and increases muscle regeneration. *Stem Cells*. 2006; **24**: 1879-1891.
- Chang HY**, Chi JT, Dudoit S, Bondre C, van de Rijn M, Botstein D, Brown PO. Diversity, topographic differentiation, and positional memory in human fibroblasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; **99**: 12877-12882.
- Chang SC**, Hoang B, Thomas JT, Vukicevic S, Luyten FP, Ryba NJ, Kozak CA, Reddi AH, Moos M Jr. Cartilage-derived morphogenetic proteins. New members of the transforming growth factor-beta superfamily predominantly expressed in long bones during human embryonic development. *J Biol Chem*. 1994; **269**: 28227-28234.
- Chapman DL**, Garvey N, Hancock S, Alexiou M, Agulnik SI, Gibson-Brown JJ, Cebra-Thomas J, Bollag RJ, Silver LM, Papaioannou VE. Expression of the T-box family genes, Tbx1-Tbx5, during early mouse development. *Dev Dyn*. 1996; **206**: 379-390.
- Chen H, Gu X, Liu Y, Wang J, Wirt SE, Bottino R, Schorle H, Sage J, Kim SK. PDGF signalling controls age-dependent proliferation in pancreatic β -cells. *Nature*. 2011; **478**: 349-355.
- Chen J**, Sanberg PR, Li Y, Wang L, Lu M, Willing AE, Sanchez-Ramos J, Chopp M. Intravenous administration of human umbilical cord blood reduces behavioral deficits after stroke in rats. *Stroke*. 2001; **32**: 2682-2688.
- Chen K**, Wang D, Du WT, Han ZB, Ren H, Chi Y, Yang SG, Zhu D, Bayard F, Han ZC. Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin Immunol*. 2010; **135**: 448-458.
- Cherry AB, Daley GQ**. Reprogramming cellular identity for regenerative medicine. *Cell*. 2012; **148**: 1110-1122.
- Chi JT**, Rodriguez EH, Wang Z, Nuyten DS, Mukherjee S, van de Rijn M, van de Vijver MJ, Hastie T, Brown PO. Gene expression programs of human smooth muscle cells: tissue-specific differentiation and prognostic significance in breast cancers. *PLoS Genet*. 2007; **3**: 1770-1784.
- Chitteti BR**, Cheng YH, Poteat B, Rodriguez-Rodriguez S, Goebel WS, Carlesso N, Kacena MA, Srour EF. Impact of interactions of cellular components of the bone marrow microenvironment on hematopoietic stem and progenitor cell function. *Blood*. 2010; **115**: 3239-3248.
- Chow A**, Lucas D, Hidalgo A, Méndez-Ferrer S, Hashimoto D, Scheiermann C, Battista M, Leboeuf M, Prophete C, van Rooijen N, Tanaka M, Merad M, Frenette PS. Bone marrow CD169⁺ macrophages promote the retention of hematopoietic stem and progenitor cells in the mesenchymal stem cell niche. *J Exp Med*. 2011; **208**: 261-271.
- Churchman SM**, Ponchel F, Boxall SA, Cuthbert R, Kouroupis D, Roshdy T, Giannoudis PV, Emery P, McGonagle D, Jones EA. Native CD271(+) multipotential stromal cells (MSCs) have a transcript profile indicative of multiple fates with prominent osteogenic and Wnt pathway signalling activity. *Arthritis Rheum*. 2012. doi: 10.1002/art.34434. [Epub ahead of print]

Ciceri F, Piemonti L. Bone marrow and pancreatic islets: an old story with new perspectives. *Cell Transplant.* 2010; **19**: 1511-1522.

Clarke DL, Clifford RL, Jindarat S, Proud D, Pang L, Belvisi M, Knox AJ. TNF α and IFN γ synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF- κ B, and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J Biol Chem.* 2010; **285**: 29101-29110.

Clements WK, Kim AD, Ong KG, Moore JC, Lawson ND, Traver D. A somitic Wnt16/Notch pathway specifies haematopoietic stem cells. *Nature.* 2011; **474**: 220-224.

Collas P. Epigenetic states in stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 2009; **1790**: 900-905.

Cooper D, Ilarregui JM, Pesoa SA, Croci DO, Perretti M, Rabinovich GA. Multiple functional targets of the immunoregulatory activity of galectin-1: Control of immune cell trafficking, dendritic cell physiology, and T-cell fate. *Methods Enzymol.* 2010; **480**: 199-244.

Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, Giunti D, Cappiello V, Cazzanti F, Risso M, Gualandi F, Mancardi GL, Pistoia V, Uccelli A. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood.* 2006; **107**: 367-372.

Creuzet S, Couly G, Vincent C, Le Douarin NM. Negative effect of Hox gene expression on the development of the neural crest-derived facial skeleton. *Development.* 2002; **129**: 4301-4313.

Croitoru-Lamoury J, Guillemin GJ, Boussin FD, Moggetti B, Gigout LI, Chéret A, Vaslin B, Le Grand R, Brew BJ, Dormont D. Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia.* 2003; **41**: 354-370.

Cutler AJ, Limbani V, Girdlestone J, Navarrete CV. Umbilical cord-derived mesenchymal stromal cells modulate monocyte function to suppress T cell proliferation. *J Immunol.* 2010; **185**: 6617-6623.

da Silva Meirelles L, Caplan AI, Nardi NB. In search of the in vivo identity of mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2008; **26**: 2287-2299.

da Silva Meirelles L, Chagastelles PC, Nardi NB. Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J Cell Sci.* 2006; **119**: 2204-2213.

Dahlberg A, Delaney C, Bernstein ID. Ex vivo expansion of human hematopoietic stem and progenitor cells. *Blood.* 2011; **117**: 6083-6090.

D'Amour KA, Bang AG, Eliazar S, Kelly OG, Agulnick AD, Smart NG, Moorman MA, Kroon E, Carpenter MK, Baetge EE. Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. *Nat Biotechnol.* 2006; **24**: 1392-1401.

Dazzi F, Krampera M. Mesenchymal stem cells and autoimmune diseases. *Best Pract Res Clin Haematol.* 2011; **24**: 49-57.

De Miguel MP, Fuentes-Julian S, Blazquez-Martinez A, Pascual CY, Aller MA, Arias J, Arnalich-Montiel F. Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells: advances and applications. *Curr Mol Med.* 2012; **12**: 574-591.

- DelaRosa O, Lombardo E.** Modulation of adult mesenchymal stem cells activity by toll-like receptors: implications on therapeutic potential. *Mediators Inflamm.* 2010; **2010**: 865601.
- Di Ianni M,** Del Papa B, De Ioanni M, Moretti L, Bonifacio E, Cecchini D, Sportoletti P, Falzetti F, Tabilio A. Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp Hematol.* 2008; **36**: 309-318.
- Di Nicola M,** Carlo-Stella C, Magni M, Milanese M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* 2002; **99**: 3838-3843.
- Domen J, Weissman IL.** Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today.* 1999; **5**: 201-208.
- Dominici M,** Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy.* 2006; **8**: 315-317.
- Dor Y.** beta-Cell proliferation is the major source of new pancreatic beta cells. *Nat Clin Pract Endocrinol Metab.* 2006; **2**: 242-243.
- Doulatov S,** Notta F, Laurenti E, Dick JE. Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell.* 2012; **10**: 120-36.
- Duboc V, Logan MP.** Regulation of limb bud initiation and limb-type morphology. *Dev Dyn.* 2011; **240**: 1017-1027.
- Duffy MM,** Pindjakova J, Hanley SA, McCarthy C, Weidhofer GA, Sweeney EM, English K, Shaw G, Murphy JM, Barry FP, Mahon BP, Belton O, Ceredig R, Griffin MD. Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur J Immunol.* 2011; **41**: 2840-2851.
- Duncan AW,** Rattis FM, DiMascio LN, Congdon KL, Pazianos G, Zhao C, Yoon K, Cook JM, Willert K, Gaiano N, Reya T. Integration of Notch and Wnt signaling in hematopoietic stem cell maintenance. *Nat Immunol.* 2005; **6**: 314-322.
- Dykstra B,** Olthof S, Schreuder J, Ritsema M, de Haan G. Clonal analysis reveals multiple functional defects of aged murine hematopoietic stem cells. *J Exp Med.* 2011; **208**: 2691-2703.
- Eckfeldt CE,** Mendenhall EM, Flynn CM, Wang TF, Pickart MA, Grindle SM, Ekker SC, Verfaillie CM. Functional analysis of human hematopoietic stem cell gene expression using zebrafish. *PLoS Biol.* 2005; **3**: e254.
- Ellisen LW,** Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J. TAN-1, the human homolog of the Drosophila notch gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. *Cell.* 1991; **66**: 649-661.
- Erices A,** Conget P, Minguell JJ. Mesenchymal progenitor cells in human umbilical cord blood. *Br J Haematol.* 2000; **109**: 235-242.
- Esaki Y,** Li Y, Sakata D, Yao C, Segi-Nishida E, Matsuoka T, Fukuda K, Narumiya S. Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2010; **107**: 12233-12238.

- Esner M**, Meilhac SM, Relaix F, Nicolas JF, Cossu G, Buckingham ME. Smooth muscle of the dorsal aorta shares a common clonal origin with skeletal muscle of the myotome. *Development*. 2006; **133**: 737-749.
- Evans PM, Liu C**. Roles of Krüpel-like factor 4 in normal homeostasis, cancer and stem cells. *Acta Biochim Biophys Sin* (Shanghai). 2008; **40**: 554-564.
- Ezquer F**, Ezquer M, Contador D, Ricca M, Simon V, Conget P. The Antidiabetic Effect of Mesenchymal Stem Cells Is Unrelated to Their Transdifferentiation Potential But to Their Capability to Restore Th1/Th2 Balance and to Modify the Pancreatic Microenvironment. *Stem Cells* 2012; **30**: 1664–1674.
- Fajka-Boja R**, Szemes M, Ion G, Légrádi A, Caron M, Monostori E. Receptor tyrosine phosphatase, CD45 binds galectin-1 but does not mediate its apoptotic signal in T cell lines. *Immunol Lett*. 2002; **82**: 149-154.
- Fiorina P**, Jurewicz M, Augello A, Vergani A, Dada S, La Rosa S, Selig M, Godwin J, Law K, Placidi C, Smith RN, Capella C, Rodig S, Adra CN, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Immunomodulatory function of bone marrow-derived mesenchymal stem cells in experimental autoimmune type 1 diabetes. *J Immunol*. 2009; **183**: 993-1004.
- Fischer UM**, Harting MT, Jimenez F, Monzon-Posadas WO, Xue H, Savitz SI, Laine GA, Cox CS Jr. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem Cells Dev*. 2009; **18**: 683-692.
- Flaquer M**, Franquesa M, Vidal A, Bolaños N, Torras J, Lloberas N, Herrero-Fresneda I, Grinyó JM, Cruzado JM. Hepatocyte growth factor gene therapy enhances infiltration of macrophages and may induce kidney repair in db/db mice as a model of diabetes. *Diabetologia*. 2012; **55**: 2059-2068.
- Fleming HE**, Janzen V, Lo Celso C, Guo J, Leahy KM, Kronenberg HM, Scadden DT. Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell*. 2008; **2**: 274-283.
- Flores-Figueroa E**, Arana-Trejo RM, Gutiérrez-Espíndola G, Pérez-Cabrera A, Mayani H. Mesenchymal stem cells in myelodysplastic syndromes: phenotypic and cytogenetic characterization. *Leuk Res*. 2005; **29**: 215-224.
- Flores-Figueroa E**, Varma S, Montgomery K, Greenberg PL, Gratzinger D. Distinctive contact between CD34+ hematopoietic progenitors and CXCL12+ CD271+ mesenchymal stromal cells in benign and myelodysplastic bone marrow. *Lab Invest*. 2012 doi:10.1038/labinvest.2012.93. [Epub ahead of print]
- Ford HL**. Homeobox genes: a link between development, cell cycle, and cancer? *Cell Biol Int*. 1998; **22**: 397-400.
- Fortunel NO**, Otu HH, Ng HH, Chen J, Mu X, Chevassut T, Li X, Joseph M, Bailey C, Hatzfeld JA, Hatzfeld A, Usta F, Vega VB, Long PM, Libermann TA, Lim B. Comment on " 'Stemness': transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells" and "a stem cell molecular signature". *Science*. 2003; **302**: 393.
- François S**, Bensidhoum M, Mouiseddine M, Mazurier C, Allenet B, Semont A, Frick J, Saché A, Bouchet S, Thierry D, Gourmelon P, Gorin NC, Chapel A. Local irradiation not only induces homing of human mesenchymal stem cells at exposed sites but promotes their widespread engraftment to multiple organs: a study of their quantitative distribution after irradiation damage. *Stem Cells*. 2006; **24**: 1020-1029.

- Friedenstein AJ**, Gorskaja JF, Kulagina NN. Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp Hematol*. 1976; **4**: 267-274.
- Gaebel R**, Furlani D, Sorg H, Polchow B, Frank J, Bieback K, Wang W, Klopsch C, Ong LL, Li W, Ma N, Steinhoff G. Cell origin of human mesenchymal stem cells determines a different healing performance in cardiac regeneration. *PLoS One*. 2011; **6**: e15652.
- Galotto M**, Berisso G, Delfino L, Podesta M, Ottaggio L, Dallorso S, Dufour C, Ferrara GB, Abbondandolo A, Dini G, Bacigalupo A, Cancedda R, Quarto R. Stromal damage as consequence of high-dose chemo/radiotherapy in bone marrow transplant recipients. *Exp Hematol*. 1999; **27**: 1460-1466.
- Gang EJ**, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 2007; **109**: 1743-1751.
- Garín MI**, Chu CC, Golshayan D, Cernuda-Morollón E, Wait R, Lechler RI. Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells. *Blood*. 2007; **109**: 2058-2065.
- Gebler A**, Zabel O, Seliger B. The immunomodulatory capacity of mesenchymal stem cells. *Trends Mol Med*. 2012; **18**: 128-134.
- Gerdoni E**, Gallo B, Casazza S, Musio S, Bonanni I, Pedemonte E, Mantegazza R, Frassoni F, Mancardi G, Pedotti R, Uccelli A. Mesenchymal stem cells effectively modulate pathogenic immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol*. 2007; **61**: 219-227.
- Gesta S**, Blüher M, Yamamoto Y, Norris AW, Berndt J, Kralisch S, Boucher J, Lewis C, Kahn CR. Evidence for a role of developmental genes in the origin of obesity and body fat distribution. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103**: 6676-66781.
- Gianani R**. Beta cell regeneration in human pancreas. *Semin Immunopathol*. 2011; **33**: 23-27.
- Gieseke F**, Böhringer J, Bussolari R, Dominici M, Handgretinger R, Müller I. Human multipotent mesenchymal stromal cells use galectin-1 to inhibit immune effector cells. *Blood*. 2010; **116**: 3770-3779.
- Glennie S**, Soeiro I, Dyson PJ, Lam EW, Dazzi F. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood*. 2005; **105**: 2821-2827.
- Gnecchi M**, Zhang Z, Ni A, Dzau VJ. Paracrine mechanisms in adult stem cell signaling and therapy. *Circ Res*. 2008; **103**: 1204-1219.
- Gonzalez-Rey E**, Anderson P, González MA, Rico L, Büscher D, Delgado M. Human adult stem cells derived from adipose tissue protect against experimental colitis and sepsis. *Gut*. 2009; **58**: 929-939.
- Graf T**. Historical origins of transdifferentiation and reprogramming. *Cell Stem Cell*. 2011; **9**: 504-516.
- Hadjantonakis AK**, Gertsenstein M, Ikawa M, Okabe M, Nagy A. Generating green fluorescent mice by germline transmission of green fluorescent ES cells. *Mech Dev*. 1998; **76**: 79-90.
- Haeckel E**: Natürliche Schöpfungsgeschichte, Berlin, Georg Reimer, 1868

Halley JD, Winkler DA, Burden FR. Toward a Rosetta stone for the stem cell genome: stochastic gene expression, network architecture, and external influences. *Stem Cell Res.* 2008; **1**: 157-168.

Han W, Ye Q, Moore MA. A soluble form of human Delta-like-1 inhibits differentiation of hematopoietic progenitor cells. *Blood.* 2000; **95**: 1616-1625.

Hao E, Tyrberg B, Itkin-Ansari P, Lakey JR, Geron I, Monosov EZ, Barcova M, Mercola M, Levine F. Beta-cell differentiation from nonendocrine epithelial cells of the adult human pancreas. *Nat Med.* 2006; **12**: 310-316.

Hao L, Sun H, Wang J, Wang T, Wang M, Zou Z. Mesenchymal stromal cells for cell therapy: besides supporting hematopoiesis. *Int J Hematol.* 2012; **95**: 34-46.

Hatzistergos KE, Quevedo H, Oskoui BN, Hu Q, Feigenbaum GS, Margitich IS, Mazhari R, Boyle AJ, Zambrano JP, Rodriguez JE, Dulce R, Pattany PM, Valdes D, Revilla C, Heldman AW, McNiece I, Hare JM. Bone marrow mesenchymal stem cells stimulate cardiac stem cell proliferation and differentiation. *Circ Res.* 2010; **107**: 913-922.

Haug JS, He XC, Grindley JC, Wunderlich JP, Gaudenz K, Ross JT, Paulson A, Wagner KP, Xie Y, Zhu R, Yin T, Perry JM, Hembree MJ, Redenbaugh EP, Radice GL, Seidel C, Li L. N-cadherin expression level distinguishes reserved versus primed states of hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; **2**: 367-379.

He J, Baum LG. Endothelial cell expression of galectin-1 induced by prostate cancer cells inhibits T-cell transendothelial migration. *Lab Invest.* 2006; **86**: 578-590.

He Q, Wan C, Li G. Concise review: multipotent mesenchymal stromal cells in blood. *Stem Cells.* 2007; **25**: 69-77.

Heissig B, Hattori K, Dias S, Friedrich M, Ferris B, Hackett NR, Crystal RG, Besmer P, Lyden D, Moore MA, Werb Z, Rafii S. Recruitment of stem and progenitor cells from the bone marrow niche requires MMP-9 mediated release of kit-ligand. *Cell.* 2002; **109**: 625-637.

Herrup K, Murcia C, Gulden F, Kuemerle B, Bilovocky N. The genetics of early cerebellar development: networks not pathways. *Prog Brain Res.* 2005; **148**: 21-27.

Hess D, Li L, Martin M, Sakano S, Hill D, Strutt B, Thyssen S, Gray DA, Bhatia M. Bone marrow-derived stem cells initiate pancreatic regeneration. *Nat Biotechnol.* 2003; **21**: 763-770.

Hof-Nahor I, Leshansky L, Shvitiel S, Eldor L, Aberdam D, Itskovitz-Eldor J, Berrih-Aknin S. Human mesenchymal stem cells shift CD8⁺ T cells towards a suppressive phenotype by inducing tolerogenic monocytes. *J Cell Sci.* 2012 Jul 5. [Epub ahead of print]

Holmberg J, Ingner G, Johansson C, Leander P, Hjalt TA. PITX2 gain-of-function induced defects in mouse forelimb development. *BMC Dev Biol.* 2008; **8**: 25.

Honczarenko M, Le Y, Swierkowski M, Ghiran I, Glodek AM, Silberstein LE. Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells.* 2006; **24**: 1030-1041.

Hong HS, Kim YH, Son Y. Perspectives on mesenchymal stem cells: tissue repair, immune modulation, and tumor homing. *Arch Pharm Res.* 2012; **35**: 201-211.

- Hooper AT**, Butler JM, Nolan DJ, Kranz A, Iida K, Kobayashi M, Kopp HG, Shido K, Petit I, Yanger K, James D, Witte L, Zhu Z, Wu Y, Pytowski B, Rosenwaks Z, Mittal V, Sato TN, Rafii S. Engraftment and reconstitution of hematopoiesis is dependent on VEGFR2-mediated regeneration of sinusoidal endothelial cells. *Cell Stem Cell*. 2009; **4**: 263-274.
- Horwitz MS**, Ilic A, Fine C, Rodriguez E, Sarvetnick N. Presented antigen from damaged pancreatic beta cells activates autoreactive T cells in virus-mediated autoimmune diabetes. *J Clin Invest*. 2002; **109**: 79-87.
- Hu B**, Wu YM, Wu Z, Phan SH. Nkx2.5/Csx represses myofibroblast differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2010; **42**: 218-226.
- Hu M, Krause D, Greaves M, Sharkis S, Dexter M, Heyworth C, Enver T. Multilineage gene expression precedes commitment in the hemopoietic system. *Genes Dev*. 1997; **11**: 774-785.
- Hughes RC**. Galectins as modulators of cell adhesion. *Biochimie*. 2001; **83**: 667-676.
- Ianus A**, Holz GG, Theise ND, Hussain MA. In vivo derivation of glucose-competent pancreatic endocrine cells from bone marrow without evidence of cell fusion. *J Clin Invest*. 2003; **111**: 843-850.
- Ibarregui JM**, Croci DO, Bianco GA, Toscano MA, Salatino M, Vermeulen ME, Geffner JR, Rabinovich GA. Tolerogenic signals delivered by dendritic cells to T cells through a galectin-1-driven immunoregulatory circuit involving interleukin 27 and interleukin 10. *Nat Immunol*. 2009; **10**: 981-991.
- Ip JE**, Wu Y, Huang J, Zhang L, Pratt RE, Dzau VJ. Mesenchymal stem cells use integrin beta1 not CXC chemokine receptor 4 for myocardial migration and engraftment. *Mol Biol Cell*. 2007; **18**: 2873-2882.
- Ito Y**, Toriuchi N, Yoshitaka T, Ueno-Kudoh H, Sato T, Yokoyama S, Nishida K, Akimoto T, Takahashi M, Miyaki S, Asahara H. The Mohawk homeobox gene is a critical regulator of tendon differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; **107**: 10538-10542.
- Izumida Y**, Aoki T, Yasuda D, Koizumi T, Suganuma C, Saito K, Murai N, Shimizu Y, Hayashi K, Odaira M, Kusano T, Kushima M, Kudano M. Hepatocyte growth factor is constitutively produced by donor-derived bone marrow cells and promotes regeneration of pancreatic beta-cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005; **333**: 273-282.
- Javazon EH**, Beggs KJ, Flake AW. Mesenchymal stem cells: paradoxes of passaging. *Exp Hematol*. 2004; **32**: 414-425.
- Jiang XX**, Zhang Y, Liu B, Zhang SX, Wu Y, Yu XD, Mao N. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005; **105**: 4120-4126.
- Jones BJ**, Brooke G, Atkinson K, McTaggart SJ. Immunosuppression by placental indoleamine 2,3-dioxygenase: a role for mesenchymal stem cells. *Placenta*. 2007; **28**: 1174-1181.
- Jones EA**, Kinsey SE, English A, Jones RA, Straszynski L, Meredith DM, Markham AF, Jack A, Emery P, McGonagle D. Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. 2002; **46**: 3349-3360.

- Jones P**, May G, Healy L, Brown J, Hoyne G, Delassus S, Enver T. Stromal expression of Jagged 1 promotes colony formation by fetal hematopoietic progenitor cells. *Blood*. 1998; **92**: 1505-1511.
- Jung Y**, Wang J, Schneider A, Sun YX, Koh-Paige AJ, Osman NI, McCauley LK, Taichman RS. Regulation of SDF-1 (CXCL12) production by osteoblasts; a possible mechanism for stem cell homing. *Bone*. 2006; **38**: 497-508.
- Jurewicz M**, Yang S, Augello A, Godwin JG, Moore RF, Azzi J, Fiorina P, Atkinson M, Sayegh MH, Abdi R. Congenic mesenchymal stem cell therapy reverses hyperglycemia in experimental type 1 diabetes. *Diabetes*. 2010; **59**: 3139-3147.
- Kadri T**, Lataillade JJ, Doucet C, Marie A, Ernou I, Bourin P, Joubert-Caron R, Caron M, Lutonski D. Proteomic study of Galectin-1 expression in human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev*. 2005; **14**: 204-212.
- Kanzler B**, Dear TN. Hox11 acts cell autonomously in spleen development and its absence results in altered cell fate of mesenchymal spleen precursors. *Dev Biol*. 2001; **234**: 231-243.
- Karanu FN**, Murdoch B, Gallacher L, Wu DM, Koremoto M, Sakano S, Bhatia M. The notch ligand jagged-1 represents a novel growth factor of human hematopoietic stem cells. *J Exp Med*. 2000; **192**: 1365-1372.
- Karanu FN**, Murdoch B, Miyabayashi T, Ohno M, Koremoto M, Gallacher L, Wu D, Itoh A, Sakano S, Bhatia M. Human homologues of Delta-1 and Delta-4 function as mitogenic regulators of primitive human hematopoietic cells. *Blood*. 2001; **97**: 1960-1967.
- Karp JM**, Leng Teo GS. Mesenchymal stem cell homing: the devil is in the details. *Cell Stem Cell*. 2009; **4**: 206-216.
- Kawada H**, Fujita J, Kinjo K, Matsuzaki Y, Tsuma M, Miyatake H, Muguruma Y, Tsuboi K, Itabashi Y, Ikeda Y, Ogawa S, Okano H, Hotta T, Ando K, Fukuda K. Nonhematopoietic mesenchymal stem cells can be mobilized and differentiate into cardiomyocytes after myocardial infarction. *Blood*. 2004; **104**: 3581-3587.
- Kiel MJ**, Morrison SJ. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat Rev Immunol*. 2008; **8**: 290-301.
- Kim YW**, Koo BK, Jeong HW, Yoon MJ, Song R, Shin J, Jeong DC, Kim SH, Kong YY. Defective Notch activation in microenvironment leads to myeloproliferative disease. *Blood*. 2008; **112**: 4628-4638.
- Krampera M**, Cosmi L, Angeli R, Pasini A, Liotta F, Andreini A, Santarlasci V, Mazzinghi B, Pizzolo G, Vinante F, Romagnani P, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 2006; **24**: 386-398.
- Kraus P**, Lufkin T. Dlx homeobox gene control of mammalian limb and craniofacial development. *Am J Med Genet A*. 2006; **140**: 1366-1374.
- Kroon E**, Martinson LA, Kadoya K, Bang AG, Kelly OG, Eliazar S, Young H, Richardson M, Smart NG, Cunningham J, Agulnick AD, D'Amour KA, Carpenter MK, Baetge EE. Pancreatic endoderm derived from human embryonic stem cells generates glucose-responsive insulin-secreting cells in vivo. *Nat Biotechnol*. 2008; **26**: 443-452.

- Kubo H**, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M, Kaneko E, Igarashi A, Nishimura M, Segoshi K, Shimazu Y, Tsuji K, Aoba T, Kato Y. Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells*. 2009; **14**: 407-424.
- Kumar JP. The sine oculis homeobox (SIX) family of transcription factors as regulators of development and disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009; **66**: 565-583.
- La M**, Cao TV, Cerchiaro G, Chilton K, Hirabayashi J, Kasai K, Olini SM, Chernajovsky Y, Perretti M. A novel biological activity for galectin-1: inhibition of leukocyte-endothelial cell interactions in experimental inflammation. *Am J Pathol*. 2003; **163**: 1505-1515.
- Lagha M**, Sato T, Regnault B, Cumano A, Zuniga A, Licht J, Relaix F, Buckingham M. Transcriptome analyses based on genetic screens for Pax3 myogenic targets in the mouse embryo. *BMC Genomics*. 2010; **11**: 696.
- Lai AY**, Lin SM, Kondo M. Heterogeneity of Flt3-expressing multipotent progenitors in mouse bone marrow. *J Immunol*. 2005; **175**: 5016-5023.
- Lam DW, LeRoith D**. The worldwide diabetes epidemic. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2012; **19**: 93-96.
- Lammert E**, Cleaver O, Melton D. Role of endothelial cells in early pancreas and liver development. *Mech Dev*. 2003; **120**: 59-64.
- Laranjeiro R**, Alcobia I, Neves H, Gomes AC, Saavedra P, Carvalho CC, Duarte A, Cidadão A, Parreira L. The notch ligand delta-like 4 regulates multiple stages of early hemato-vascular development. *PLoS One*. 2012; **7**: e34553.
- Le Blanc K, Mougiakakos D**. Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nat Rev Immunol*. 2012; **12**: 383-396.
- Le Blanc K**, Rasmusson I, Sundberg B, Götherström C, Hassan M, Uzunel M, Ringdén O. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *Lancet*. 2004; **363**: 1439-1441.
- Le Blanc K**, Tammik L, Sundberg B, Haynesworth SE, Ringdén O. Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand J Immunol*. 2003; **57**: 11-20.
- Lee RH**, Pulin AA, Seo MJ, Kota DJ, Ylostalo J, Larson BL, Semprun-Prieto L, Delafontaine P, Prockop DJ. Intravenous hMSCs improve myocardial infarction in mice because cells embolized in lung are activated to secrete the anti-inflammatory protein TSG-6. *Cell Stem Cell*. 2009; **5**: 54-63.
- Lee RH**, Seo MJ, Reger RL, Spees JL, Pulin AA, Olson SD, Prockop DJ. Multipotent stromal cells from human marrow home to and promote repair of pancreatic islets and renal glomeruli in diabetic NOD/scid mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006; **103**: 17438-1743.
- Lengner CJ**, Camargo FD, Hochedlinger K, Welstead GG, Zaidi S, Gokhale S, Scholer HR, Tomilin A, Jaenisch R. Oct4 expression is not required for mouse somatic stem cell self-renewal. *Cell Stem Cell*. 2007; **1**: 403-415.

- Lepelletier Y**, Lecourt S, Renand A, Arnulf B, Vanneaux V, Femand JP, Menasché P, Domet T, Marolleau JP, Hermine O, Larghero J. Galectin-1 and semaphorin-3A are two soluble factors conferring T-cell immunosuppression to bone marrow mesenchymal stem cell. *Stem Cells Dev.* 2010; **19**: 1075-1079.
- Leucht P**, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development.* 2008; **135**: 2845-2854.
- Levi G**, Tarrab-Hazdai R, Teichberg VI. Prevention and therapy with electrolectin of experimental autoimmune myasthenia gravis in rabbits. *Eur J Immunol.* 1983; **13**: 500-507.
- Li FX**, Zhu JW, Tessem JS, Beilke J, Varella-Garcia M, Jensen J, Hogan CJ, DeGregori J. The development of diabetes in E2f1/E2f2 mutant mice reveals important roles for bone marrow-derived cells in preventing islet cell loss. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003; **100**: 12935-12940.
- Li H**, Zuo S, He Z, Yang Y, Pasha Z, Wang Y, Xu M. Paracrine factors released by GATA-4 overexpressed mesenchymal stem cells increase angiogenesis and cell survival. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2010; **299**: H1772-1781.
- Li QY**, Newbury-Ecob RA, Terrett JA, Wilson DI, Curtis AR, Yi CH, Gebuhr T, Bullen PJ, Robson SC, Strachan T, Bonnet D, Lyonnet S, Young ID, Raeburn JA, Buckler AJ, Law DJ, Brook JD. Holt-Oram syndrome is caused by mutations in TBX5, a member of the Brachyury (T) gene family. *Nat Genet.* 1997; **15**: 21-29.
- Like AA**, Rossini AA. Streptozotocin-induced pancreatic insulinitis: new model of diabetes mellitus. *Science.* 1976; **193**: 415-417.
- Liotta F**, Angeli R, Cosmi L, Filì L, Manuelli C, Frosali F, Mazzinghi B, Maggi L, Pasini A, Lisi V, Santarlasci V, Consoloni L, Angelotti ML, Romagnani P, Parronchi P, Krampera M, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. 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.* 2008; **26**: 279-289.
- Liotta F**, Frosali F, Querci V, Mantei A, Filì L, Maggi L, Mazzinghi B, Angeli R, Ronconi E, Santarlasci V, Biagioli T, Lasagni L, Ballerini C, Parronchi P, Scheffold A, Cosmi L, Maggi E, Romagnani S, Annunziato F. Human immature myeloid dendritic cells trigger a TH2-polarizing program via Jagged-1/Notch interaction. *J Allergy Clin Immunol.* 2008; **121**: 1000-5.e8.
- Little MH**. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res.* 2012; **8**: 58-73.
- Liu J**, Sato C, Cerletti M, Wagers A. Notch signaling in the regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Curr Top Dev Biol.* 2010; **92**: 367-409.
- Liu W**, Watson SS, Lan Y, Keene DR, Ovitt CE, Liu H, Schweitzer R, Jiang R. The atypical homeodomain transcription factor Mohawk controls tendon morphogenesis. *Mol Cell Biol.* 2010; **30**: 4797-4807.
- Lo Celso C**, Fleming HE, Wu JW, Zhao CX, Miake-Lye S, Fujisaki J, Côté D, Rowe DW, Lin CP, Scadden DT. Live-animal tracking of individual haematopoietic stem/progenitor cells in their niche. *Nature.* 2009; **457**: 92-96.

- Lo Celso C**, Lin CP, Scadden DT. In vivo imaging of transplanted hematopoietic stem and progenitor cells in mouse calvarium bone marrow. *Nat Protoc.* 2011; **6**: 1-14.
- Lombardo E**, DelaRosa O, Mancheño-Corvo P, Menta R, Ramírez C, Büscher D. Toll-like receptor-mediated signaling in human adipose-derived stem cells: implications for immunogenicity and immunosuppressive potential. *Tissue Eng Part A.* 2009; **15**: 1579-1589.
- Madec AM**, Mallone R, Afonso G, Abou Mrad E, Mesnier A, Eljaafari A, Thivolet C. Mesenchymal stem cells protect NOD mice from diabetes by inducing regulatory T cells. *Diabetologia.* 2009; **52**: 1391-1399.
- Maggini J**, Mirkin G, Bognanni I, Holmberg J, Piazzón IM, Nepomnaschy I, Costa H, Cañones C, Raiden S, Vermeulen M, Geffner JR. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One.* 2010; **5**: e9252.
- Mahmood A**, Lu D, Lu M, Chopp M. Treatment of traumatic brain injury in adult rats with intravenous administration of human bone marrow stromal cells. *Neurosurgery.* 2003; **53**: 697-702.
- Maillard I**, Koch U, Dumortier A, Shestova O, Xu L, Sai H, Pross SE, Aster JC, Bhandoola A, Radtke F, Pear WS. Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell.* 2008; **2**: 356-366.
- Mancini SJ**, Mantei N, Dumortier A, Suter U, MacDonald HR, Radtke F. Jagged1-dependent Notch signaling is dispensable for hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Blood.* 2005; **105**: 2340-2342.
- Mazo IB**, Gutierrez-Ramos JC, Frenette PS, Hynes RO, Wagner DD, von Andrian UH. Hematopoietic progenitor cell rolling in bone marrow microvessels: parallel contributions by endothelial selectins and vascular cell adhesion molecule 1. *J Exp Med.* 1998; **188**: 465-474.
- Mazo IB, Massberg S, von Andrian UH. Hematopoietic stem and progenitor cell trafficking. *Trends Immunol.* 2011; **32**: 493-503.
- McGraw J**, McPhail LT, Oschipok LW, Horie H, Poirier F, Steeves JD, Ramer MS, Tetzlaff W. Galectin-1 in regenerating motoneurons. *Eur J Neurosci.* 2004; **20**: 2872-2880.
- Medzhitov R. Origin and physiological roles of inflammation. *Nature.* 2008; **454**: 428-435.
- Meijlink F**, Beverdam A, Brouwer A, Oosterveen TC, Berge DT. Vertebrate aristaless-related genes. *Int J Dev Biol.* 1999; **43**: 651-663.
- Meisel R**, Zibert A, Laryea M, Göbel U, Däubener W, Dilloo D. Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2,3-dioxygenase-mediated tryptophan degradation. *Blood.* 2004; **103**: 4619-4621.
- Mellado-Gil J**, Rosa TC, Demirci C, Gonzalez-Pertusa JA, Velazquez-Garcia S, Ernst S, Valle S, Vasavada RC, Stewart AF, Alonso LC, Garcia-Ocaña A. Disruption of hepatocyte growth factor/c-Met signaling enhances pancreatic beta-cell death and accelerates the onset of diabetes. *Diabetes.* 2011; **60**: 525-536.
- Méndez-Ferrer S**, Lucas D, Battista M, Frenette PS. Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature.* 2008; **452**: 442-447.

- Méndez-Ferrer S**, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. 2010; **466**: 829-834.
- Menicanin D**, Bartold PM, Zannettino AC, Gronthos S. Genomic profiling of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev*. 2009; **5**: 36-50.
- Ming GL, Song H**. Adult neurogenesis in the mammalian brain: significant answers and significant questions. *Neuron*. 2011; **70**: 687-702.
- Mohn F, Schübeler D**. Genetics and epigenetics: stability and plasticity during cellular differentiation. *Trends Genet*. 2009; **25**: 129-136.
- Molineux G, Pojda Z, Hampson IN, Lord BI, Dexter TM. Transplantation potential of peripheral blood stem cells induced by granulocyte colony-stimulating factor. *Blood*. 1990; **76**: 2153-2158.
- Montane J**, Bischoff L, Soukhatcheva G, Dai DL, Hardenberg G, Levings MK, Orban PC, Kieffer TJ, Tan R, Verchere CB. Prevention of murine autoimmune diabetes by CCL22-mediated Treg recruitment to the pancreatic islets. *J Clin Invest*. 2011; **121**: 3024-3028.
- Morgan TH**: The theory of the gene. *American Naturalist* 1917; **51**: 513-544.
- Morigi M**, Rota C, Montemurro T, Montelatici E, Lo Cicero V, Imberti B, Abbate M, Zoja C, Cassis P, Longaretti L, Rebulla P, Introna M, Capelli C, Benigni A, Remuzzi G, Lazzari L. Life-sparing effect of human cord blood-mesenchymal stem cells in experimental acute kidney injury. *Stem Cells*. 2010; **28**: 513-522.
- Morikawa S**, Mabuchi Y, Niibe K, Suzuki S, Nagoshi N, Sunabori T, Shimmura S, Nagai Y, Nakagawa T, Okano H, Matsuzaki Y. Development of mesenchymal stem cells partially originate from the neural crest. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; **379**: 1114-1119.
- Morrison SJ, Spradling AC**. Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*. 2008; **132**: 598-611.
- Muller-Sieburg CE**, Sieburg HB, Bernitz JM, Cattarossi G. Stem cell heterogeneity: implications for aging and regenerative medicine. *Blood*. 2012; **119**: 3900-3907.
- Murakami M, Kudo I**. Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res*. 2004; **43**: 3-35.
- Murray PJ, Wynn TA**. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol*. 2011; **11**: 723-737.
- Murry CE, Keller G**. Differentiation of embryonic stem cells to clinically relevant populations: lessons from embryonic development. *Cell*. 2008; **132**: 661-680.
- Naveiras O**, Nardi V, Wenzel PL, Hauschka PV, Fahey F, Daley GQ. Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature*. 2009; **460**: 259-263.
- Németh K**, Leelahavanichkul A, Yuen PS, Mayer B, Parmelee A, Doi K, Robey PG, Leelahavanichkul K, Koller BH, Brown JM, Hu X, Jelinek I, Star RA, Mezey E. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat Med*. 2009; **15**: 42-49.

- Nimer SD.** Myelodysplastic syndromes. *Blood*. 2008; **111**: 4841-4851.
- Noiseux N, Gneccchi M, Lopez-Illasaca M, Zhang L, Solomon SD, Deb A, Dzau VJ, Pratt RE.** Mesenchymal stem cells overexpressing Akt dramatically repair infarcted myocardium and improve cardiac function despite infrequent cellular fusion or differentiation. *Mol Ther*. 2006; **14**: 840-850.
- Offner H, Celnik B, Bringman TS, Casentini-Borocz D, Nedwin GE, Vandenbark AA.** Recombinant human beta-galactoside binding lectin suppresses clinical and histological signs of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1990; **28**: 177-184.
- Oh DY, Cui P, Hosseini H, Mosse J, Toh BH, Chan J.** Potently immunosuppressive 5-fluorouracil-resistant mesenchymal stromal cells completely remit an experimental autoimmune disease. *J Immunol*. 2012; **188**: 2207-2217.
- Oh JY, Roddy GW, Choi H, Lee RH, Ylöstalo JH, Rosa RH Jr, Prockop DJ.** Anti-inflammatory protein TSG-6 reduces inflammatory damage to the cornea following chemical and mechanical injury. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010; **107**: 16875-16880.
- Ohishi K, Varnum-Finney B, Bernstein ID.** Delta-1 enhances marrow and thymus repopulating ability of human CD34(+)CD38(-) cord blood cells. *J Clin Invest*. 2002 ; **110**: 1165-1174.
- Omatsu Y, Sugiyama T, Kohara H, Kondoh G, Fujii N, Kohno K, Nagasawa T.** The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity*. 2010; **33**: 387-399.
- Opitz CA, Litzenburger UM, Lutz C, Lanz TV, Tritschler I, Köppel A, Tolosa E, Hoberg M, Anderl J, Aicher WK, Weller M, Wick W, Platten M.** Toll-like receptor engagement enhances the immunosuppressive properties of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells by inducing indoleamine-2,3-dioxygenase-1 via interferon-beta and protein kinase R. *Stem Cells*. 2009; **27**: 909-919.
- Orkin SH, Zon LI.** Hematopoiesis: an evolving paradigm for stem cell biology. *Cell*. 2008; **132**: 631-644.
- Ortiz LA, Gambelli F, McBride C, Gaupp D, Baddoo M, Kaminski N, Phinney DG.** Mesenchymal stem cell engraftment in lung is enhanced in response to bleomycin exposure and ameliorates its fibrotic effects. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; **100**: 8407-8411.
- Paik SG, Fleischer N, Shin SI.** Insulin-dependent diabetes mellitus induced by ubdiabetogenic doses of streptozotocin: obligatory role of cell-mediated autoimmune processes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1980; **77**: 6129-6133.
- Parekkadan B, van Poll D, Suganuma K, Carter EA, Berthiaume F, Tilles AW, Yarmush ML.** Mesenchymal stem cell-derived molecules reverse fulminant hepatic failure. *PLoS One*. 2007; **2**: e941.
- Park D, Spencer JA, Koh BI, Kobayashi T, Fujisaki J, Clemens TL, Lin CP, Kronenberg HM, Scadden DT.** Endogenous bone marrow MSCs are dynamic, fate-restricted participants in bone maintenance and regeneration. *Cell Stem Cell*. 2012; **10**: 259-272.

- Peister A**, Mellad JA, Larson BL, Hall BM, Gibson LF, Prockop DJ. 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*. 2004; **103**: 1662-1668.
- Pelekanos RA**, Li J, Gongora M, Chandrakanthan V, Scown J, Suhaimi N, Brooke G, Christensen ME, Doan T, Rice AM, Osborne GW, Grimmond SM, Harvey RP, Atkinson K, Little MH. Comprehensive transcriptome and immunophenotype analysis of renal and cardiac MSC-like populations supports strong congruence with bone marrow MSC despite maintenance of distinct identities. *Stem Cell Res*. 2012; **8**: 58-73.
- Penick KJ**, Solchaga LA, Welter JF. High-throughput aggregate culture system to assess the chondrogenic potential of mesenchymal stem cells. *Biotechniques*. 2005; **39**: 687-691.
- Perillo NL**, Pace KE, Seilhamer JJ, Baum LG. Apoptosis of T cells mediated by galectin-1. *Nature*. 1995; **378**: 736-739.
- Perone MJ**, Bertera S, Shufesky WJ, Divito SJ, Montecalvo A, Mathers AR, Larregina AT, Pang M, Seth N, Wucherpennig KW, Trucco M, Baum LG, Morelli AE. Suppression of autoimmune diabetes by soluble galectin-1. *J Immunol*. 2009; **182**: 2641-2653.
- Pevsner-Fischer M**, Levin S, Zipori D. The origins of mesenchymal stromal cell heterogeneity. *Stem Cell Rev*. 2011; **7**: 560-568.
- Pittenger MF**, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999; **284**: 143-147.
- Pouget C**, Pottin K, Jaffredo T. Sclerotomal origin of vascular smooth muscle cells and pericytes in the embryo. *Dev Biol*. 2008; **315**: 437-447.
- Prockop DJ, Oh JY**. Medical therapies with adult stem/progenitor cells (MSCs): a backward journey from dramatic results in vivo to the cellular and molecular explanations. *J Cell Biochem*. 2012; **113**: 1460-1469.
- Puri MC, Nagy A**. Concise review: Embryonic stem cells versus induced pluripotent stem cells: the game is on. *Stem Cells*. 2012; **30**: 10-14.
- Puri S, Hebrok M**. Cellular plasticity within the pancreas--lessons learned from development. *Dev Cell*. 2010; **18**: 342-356.
- Qu S**, Tucker SC, Zhao Q, deCrombrughe B, Wisdom R. Physical and genetic interactions between Alx4 and Cart1. *Development*. 1999; **126**: 359-369.
- Raaijmakers MH. Myelodysplastic syndromes: revisiting the role of the bone marrow microenvironment in disease pathogenesis. *Int J Hematol*. 2012; **95**: 17-25.
- Rabinovich GA**, Daly G, Dreja H, Tailor H, Riera CM, Hirabayashi J, Chernajovsky Y. Recombinant galectin-1 and its genetic delivery suppress collagen-induced arthritis via T cell apoptosis. *J Exp Med*. 1999; **190**: 385-398.
- Rabinovich GA**, Sotomayor CE, Riera CM, Bianco I, Correa SG. Evidence of a role for galectin-1 in acute inflammation. *Eur J Immunol*. 2000; **30**: 1331-1339.
- Rabinovich GA**, Toscano MA, Iarregui JM, Rubinstein N. Shedding light on the immunomodulatory properties of galectins: novel regulators of innate and adaptive immune responses. *Glycoconj J*. 2004; **19**: 565-573.

- Rabinovich GA, Vidal M.** Galectins and microenvironmental niches during hematopoiesis. *Curr Opin Hematol.* 2011; **18**: 443-451.
- Raffi S, Mohle R, Shapiro F, Frey BM, Moore MA. Regulation of hematopoiesis by microvascular endothelium. *Leuk Lymphoma.* 1997; **27**: 375-386.
- Ramasamy R, Fazekasova H, Lam EW, Soeiro I, Lombardi G, Dazzi F.** Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation.* 2007; **83**: 71-76.
- Ren G, Zhang L, Zhao X, Xu G, Zhang Y, Roberts AI, Zhao RC, Shi Y.** Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* 2008; **2**: 141-150.
- Ren G, Zhao X, Zhang L, Zhang J, L'Huillier A, Ling W, Roberts AI, Le AD, Shi S, Shao C, Shi Y.** Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *J Immunol.* 2010; **184**: 2321-2328.
- Revest JM, Suniara RK, Kerr K, Owen JJ, Dickson C.** Development of the thymus requires signaling through the fibroblast growth factor receptor R2-IIIb. *J Immunol.* 2001; **167**: 1954-1961.
- Rezzani R.** Cyclosporine A and adverse effects on organs: histochemical studies. *Prog Histochem Cytochem.* 2004; **39**: 85-128.
- Riazi AM, Takeuchi JK, Hornberger LK, Zaidi SH, Amini F, Coles J, Bruneau BG, Van Arsdell GS.** NKX2-5 regulates the expression of beta-catenin and GATA4 in ventricular myocytes. *PLoS One.* 2009; **4**: e5698.
- Rieck S, Kaestner KH.** Expansion of beta-cell mass in response to pregnancy. *Trends Endocrinol Metab.* 2010; **21**: 151-158.
- Ringe J, Strassburg S, Neumann K, Endres M, Notter M, Burmester GR, Kaps C, Sittinger M.** Towards in situ tissue repair: human mesenchymal stem cells express chemokine receptors CXCR1, CXCR2 and CCR2, and migrate upon stimulation with CXCL8 but not CCL2. *J Cell Biochem.* 2007; **101**: 135-146.
- Roberts CW, Shutter JR, Korsmeyer SJ.** Hox11 controls the genesis of the spleen. *Nature.* 1994; **368**: 747-749.
- Rocheftort GY, Delorme B, Lopez A, Héroult O, Bonnet P, Charbord P, Eder V, Domenech J.** Multipotential mesenchymal stem cells are mobilized into peripheral blood by hypoxia. *Stem Cells.* 2006; **24**: 2202-2208.
- Rojas M, Xu J, Woods CR, Mora AL, Spears W, Roman J, Brigham KL.** Bone marrow-derived mesenchymal stem cells in repair of the injured lung. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2005; **33**: 145-152.
- Rüster B, Göttig S, Ludwig RJ, Bistran R, Müller S, Seifried E, Gille J, Henschler R.** Mesenchymal stem cells display coordinated rolling and adhesion behavior on endothelial cells. *Blood.* 2006; **108**: 3938-3944.
- Ryan JM, Barry F, Murphy JM, Mahon BP.** Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin Exp Immunol.* 2007; **149**: 353-363.

- Sacchetti B**, Funari A, Michienzi S, Di Cesare S, Piersanti S, Saggio I, Tagliafico E, Ferrari S, Robey PG, Riminucci M, Bianco P. Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. 2007; **131**: 324-336.
- Sackstein R**, Merzaban JS, Cain DW, Dagia NM, Spencer JA, Lin CP, Wohlgemuth R. Ex vivo glycan engineering of CD44 programs human multipotent mesenchymal stromal cell trafficking to bone. *Nat Med*. 2008; **14**: 181-187.
- Sansregret L, Nepveu A**. The multiple roles of CUX1: insights from mouse models and cell-based assays. *Gene*. 2008; **412**: 84-94.
- Sarnat HB**, Benjamin DR, Siebert JR, Kletter GB, Cheyette SR. Agenesis of the mesencephalon and metencephalon with cerebellar hypoplasia: putative mutation in the EN2 gene--report of 2 cases in early infancy. *Pediatr Dev Pathol*. 2002; **5**: 54-68.
- Sato K**, Ozaki K, Oh I, Meguro A, Hatanaka K, Nagai T, Muroi K, Ozawa K. Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood*. 2007; **109**: 228-234.
- Schofield R**. The stem cell system. *Biomed Pharmacother*. 1983; **37**: 375-380.
- Schroeder MA, DiPersio JF**. Mobilization of hematopoietic stem and leukemia cells. *J Leukoc Biol*. 2012; **91**: 47-57.
- Settle SH Jr**, Rountree RB, Sinha A, Thacker A, Higgins K, Kingsley DM. Multiple joint and skeletal patterning defects caused by single and double mutations in the mouse Gdf6 and Gdf5 genes. *Dev Biol*. 2003; **254**: 116-130.
- Seymour PA, Sander M**. Historical perspective: beginnings of the beta-cell: current perspectives in beta-cell development. *Diabetes*. 2011; **60**: 364-376.
- Shen B**, Bhargav D, Wei A, Williams LA, Tao H, Ma DD, Diwan AD. BMP-13 emerges as a potential inhibitor of bone formation. *Int J Biol Sci*. 2009; **5**: 192-200.
- Sheng H**, Wang Y, Jin Y, Zhang Q, Zhang Y, Wang L, Shen B, Yin S, Liu W, Cui L, Li N. A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res*. 2008; **18**: 846-857.
- Shetty V**, Hussaini S, Alvi S, Joshi L, Shaher A, Dangerfield B, Nascimben F, Mundle S, Allampallam K, Reddy P, Galili N, Raza A. Excessive apoptosis, increased phagocytosis, nuclear inclusion bodies and cylindrical confronting cisternae in bone marrow biopsies of myelodysplastic syndrome patients. *Br J Haematol*. 2002; **116**: 817-825.
- Shi D**, Liao L, Zhang B, Liu R, Dou X, Li J, Zhu X, Yu L, Chen D, Zhao RC. Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1-mediated inhibition of NF- κ B signaling. *Exp Hematol*. 2011; **39**: 214-224.
- Shi S, Gronthos S**. Perivascular niche of postnatal mesenchymal stem cells in human bone marrow and dental pulp. *J Bone Miner Res*. 2003; **18**: 696-704.
- 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, Ren G. Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res*. 2010; **20**: 510-518.
- Shi Y**, Su J, Roberts AI, Shou P, Rabson AB, Ren G. How mesenchymal stem cells interact with tissue immune responses. *Trends Immunol*. 2012; **33**: 136-143.

Sica A, Mantovani A. Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *J Clin Invest.* 2012; **122**: 787-795.

Silva WA Jr, Covas DT, Panepucci RA, Proto-Siqueira R, Siufi JL, Zanette DL, Santos AR, Zago MA. The profile of gene expression of human marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2003; **21**: 661-669.

Slack JM. Origin of stem cells in organogenesis. *Science.* 2008; **322**: 1498-1501.

Sordi V, Malosio ML, Marchesi F, Mercalli A, Melzi R, Giordano T, Belmonte N, Ferrari G, Leone BE, Bertuzzi F, Zerbini G, Allavena P, Bonifacio E, Piemonti L. Bone marrow mesenchymal stem cells express a restricted set of functionally active chemokine receptors capable of promoting migration to pancreatic islets. *Blood.* 2005; **106**: 419-427.

Spaeth E, Klopp A, Dembinski J, Andreeff M, Marini F. Inflammation and tumor microenvironments: defining the migratory itinerary of mesenchymal stem cells. *Gene Ther.* 2008; **15**: 730-738.

Spaggiari GM, Capobianco A, Becchetti S, Mingari MC, Moretta L. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2-induced NK-cell proliferation. *Blood.* 2006; **107**: 1484-1490.

Steensma DP, Tefferi A. The myelodysplastic syndrome(s): a perspective and review highlighting current controversies. *Leuk Res.* 2003; **27**: 95-120.

Stier S, Cheng T, Dombkowski D, Carlesso N, Scadden DT. Notch1 activation increases hematopoietic stem cell self-renewal in vivo and favors lymphoid over myeloid lineage outcome. *Blood.* 2002; **99**: 2369-2378.

Stier S, Ko Y, Forkert R, Lutz C, Neuhaus T, Grünewald E, Cheng T, Dombkowski D, Calvi LM, Rittling SR, Scadden DT. Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J Exp Med.* 2005; **201**: 1781-1791.

Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity.* 2006; **25**: 977-988.

Suzuki E, Evans T, Lowry J, Truong L, Bell DW, Testa JR, Walsh K. The human GATA-6 gene: structure, chromosomal location, and regulation of expression by tissue-specific and mitogen-responsive signals. *Genomics.* 1996; **38**: 283-290.

Taichman RS, Reilly MJ, Verma RS, Emerson SG. Augmented production of interleukin-6 by normal human osteoblasts in response to CD34+ hematopoietic bone marrow cells in vitro. *Blood.* 1997; **89**: 1165-1172.

Takaku T, Malide D, Chen J, Calado RT, Kajigaya S, Young NS. Hematopoiesis in 3 dimensions: human and murine bone marrow architecture visualized by confocal microscopy. *Blood.* 2010; **116**: e41-55.

Tassabehji M, Fang ZM, Hilton EN, McGaughan J, Zhao Z, de Bock CE, Howard E, Malass M, Donnai D, Diwan A, Manson FD, Murrell D, Clarke RA. Mutations in GDF6 are associated with vertebral segmentation defects in Klippel-Feil syndrome. *Hum Mutat.* 2008; **29**: 1017-1027.

Tennant GB, Walsh V, Truran LN, Edwards P, Mills KI, Burnett AK. Abnormalities of adherent layers grown from bone marrow of patients with myelodysplasia. *Br J Haematol.* 2000; **111**: 853-862.

Tolar J, Nauta AJ, Osborn MJ, Panoskaltsis Mortari A, McElmurry RT, Bell S, Xia L, Zhou N, Riddle M, Schroeder TM, Westendorf JJ, McIvor RS, Hogendoorn PC, Szuhai K, Oseth L, Hirsch B, Yant SR, Kay MA, Peister A, Prockop DJ, Fibbe WE, Blazar BR. Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 2007; **25**: 371-379.

Toma C, Pittenger MF, Cahill KS, Byrne BJ, Kessler PD. Human mesenchymal stem cells differentiate to a cardiomyocyte phenotype in the adult murine heart. *Circulation.* 2002; **105**: 93-98.

Tondreau T, Meuleman N, Delforge A, Dejeneffe M, Leroy R, Massy M, Mortier C, Bron D, Lagneaux L. Mesenchymal stem cells derived from CD133-positive cells in mobilized peripheral blood and cord blood: proliferation, Oct4 expression, and plasticity. *Stem Cells.* 2005; **23**: 1105-1112.

Tormin A, Li O, Brune JC, Walsh S, Schütz B, Ehinger M, Ditzel N, Kassem M, Scheduling S. CD146 expression on primary nonhematopoietic bone marrow stem cells is correlated with in situ localization. *Blood.* 2011; **117**: 5067-5077.

Traggiai E, Volpi S, Schena F, Gattorno M, Ferlito F, Moretta L, Martini A. Bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce both polyclonal expansion and differentiation of B cells isolated from healthy donors and systemic lupus erythematosus patients. *Stem Cells.* 2008; **26**: 562-569.

van Poll D, Parekkadan B, Cho CH, Berthiaume F, Nahmias Y, Tilles AW, Yarmush ML. Mesenchymal stem cell-derived molecules directly modulate hepatocellular death and regeneration in vitro and in vivo. *Hepatology.* 2008; **47**: 1634-1643.

Varnum-Finney B, Brashem-Stein C, Bernstein ID. Combined effects of Notch signaling and cytokines induce a multiple log increase in precursors with lymphoid and myeloid reconstituting ability. *Blood.* 2003; **101**: 1784-1789.

Varnum-Finney B, Xu L, Brashem-Stein C, Nourigat C, Flowers D, Bakkour S, Pear WS, Bernstein ID. Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat Med.* 2000; **6**: 1278-1281.

Vennemann A, Gerstner A, Kern N, Ferreiros Bouzas N, Narumiya S, Maruyama T, Nüsing RM. PTGS-2-PTGER2/4 Signaling Pathway Partially Protects From Diabetogenic Toxicity of Streptozotocin in Mice. *Diabetes.* 2012; **61**: 1879-1887.

Vieira NM, Zucconi E, Bueno CR Jr, Secco M, Suzuki MF, Bartolini P, Vainzof M, Zatz M. Human multipotent mesenchymal stromal cells from distinct sources show different in vivo potential to differentiate into muscle cells when injected in dystrophic mice. *Stem Cell Rev.* 2010; **6**: 560-566.

Visnjic D, Kalajzic Z, Rowe DW, Katavic V, Lorenzo J, Aguila HL. Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood.* 2004; **103**: 3258-3264.

von Bahr L, Batsis I, Moll G, Hägg M, Szakos A, Sundberg B, Uzunel M, Ringden O, Le Blanc K. Analysis of tissues following mesenchymal stromal cell therapy in humans indicates limited long-term engraftment and no ectopic tissue formation. *Stem Cells.* 2012; **30**: 1575-1578.

- Waddington CH:** The Strategy of the Genes. Allen & Unwin, London, 1957
- Walczak P,** Zhang J, Gilad AA, Kedziorek DA, Ruiz-Cabello J, Young RG, Pittenger MF, van Zijl PC, Huang J, Bulte JW. Dual-modality monitoring of targeted intraarterial delivery of mesenchymal stem cells after transient ischemia. *Stroke*. 2008; **39**: 1569-1574.
- Wang H,** Cao F, De A, Cao Y, Contag C, Gambhir SS, Wu JC, Chen X. Trafficking mesenchymal stem cell engraftment and differentiation in tumor-bearing mice by bioluminescence imaging. *Stem Cells*. 2009; **27**: 1548-1558.
- Wang KC,** Helms JA, Chang HY. Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol*. 2009; **19**: 268-275.
- Wang LD, Wagers AJ.** Dynamic niches in the origination and differentiation of haematopoietic stem cells. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2011; **12**: 643-655.
- Wardle FC, Papaioannou VE.** Teasing out T-box targets in early mesoderm. *Curr Opin Genet Dev*. 2008; **18**: 418-425.
- Wasteson P,** Johansson BR, Jukkola T, Breuer S, Akyürek LM, Partanen J, Lindahl P. Developmental origin of smooth muscle cells in the descending aorta in mice. *Development*. 2008; **135**: 1823-1832.
- Waterman RS,** Tomchuck SL, Henkle SL, Betancourt AM. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One*. 2010; **5**: e10088.
- Watt AJ,** Zhao R, Li J, Duncan SA. Development of the mammalian liver and ventral pancreas is dependent on GATA4. *BMC Dev Biol*. 2007; **7**: 37.
- Watt FM, Hogan BL.** Out of Eden: stem cells and their niches. *Science*. 2000; **287**: 1427-1430.
- Weber JM, Calvi LM.** Notch signaling and the bone marrow hematopoietic stem cell niche. *Bone*. 2010; **46**: 281-285.
- Weber JM,** Forsythe SR, Christianson CA, Frisch BJ, Gigliotti BJ, Jordan CT, Milner LA, Guzman ML, Calvi LM. Parathyroid hormone stimulates expression of the Notch ligand Jagged1 in osteoblastic cells. *Bone*. 2006; **39**: 485-493.
- Williams AR, Hare JM.** Mesenchymal stem cells: biology, pathophysiology, translational findings, and therapeutic implications for cardiac disease. *Circ Res*. 2011; **109**: 923-940.
- Wilson A,** Laurenti E, Oser G, van der Wath RC, Blanco-Bose W, Jaworski M, Offner S, Dunant CF, Eshkind L, Bockamp E, Lió P, Macdonald HR, Trumpp A. Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell*. 2008; **135**: 1118-1129.
- Wu J,** Sun Z, Sun HS, Wu J, Weisel RD, Keating A, Li ZH, Feng ZP, Li RK. Intravenously administered bone marrow cells migrate to damaged brain tissue and improve neural function in ischemic rats. *Cell Transplant*. 2008; **16**: 993-1005.
- Wu M,** Kwon HY, Rattis F, Blum J, Zhao C, Ashkenazi R, Jackson TL, Gaiano N, Oliver T, Reya T. Imaging hematopoietic precursor division in real time. *Cell Stem Cell*. 2007; **1**: 541-554.

- Xu F**, Shi J, Yu B, Ni W, Wu X, Gu Z. Chemokines mediate mesenchymal stem cell migration toward gliomas in vitro. *Oncol Rep*. 2010; **23**: 1561-1567.
- Yalniz M, Pour PM**. Are there any stem cells in the pancreas? *Pancreas*. 2005; **31**: 108-118.
- Yañez R**, Oviedo A, Aldea M, Bueren JA, Lamana ML. Prostaglandin E2 plays a key role in the immunosuppressive properties of adipose and bone marrow tissue-derived mesenchymal stromal cells. *Exp Cell Res*. 2010; **316**: 3109-3123.
- Yang RY**, Rabinovich GA, Liu FT. Galectins: structure, function and therapeutic potential. *Expert Rev Mol Med*. 2008; **10**: e17.
- Yang SH**, Park MJ, Yoon IH, Kim SY, Hong SH, Shin JY, Nam HY, Kim YH, Kim B, Park CG. Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp Mol Med*. 2009; **41**: 315-324.
- Yanger K, Stanger BZ**. Facultative stem cells in liver and pancreas: fact and fancy. *Dev Dyn*. 2011; **240**: 521-259.
- Yechoor V, Chan L**. Minireview: beta-cell replacement therapy for diabetes in the 21st century: manipulation of cell fate by directed differentiation. *Mol Endocrinol*. 2010; **24**: 1501-1511.
- Yin T, Li L**. The stem cell niches in bone. *J Clin Invest*. 2006; **116**: 1195-1201.
- Zanini C**, Bruno S, Mandili G, Baci D, Cerutti F, Cenacchi G, Izzi L, Camussi G, Forni M. Differentiation of mesenchymal stem cells derived from pancreatic islets and bone marrow into islet-like cell phenotype. *PLoS One*. 2011; **6**: e28175.
- Zappia E**, Casazza S, Pedemonte E, Benvenuto F, Bonanni I, Gerdoni E, Giunti D, Ceravolo A, Cazzanti F, Frassoni F, Mancardi G, Uccelli A. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005; **106**: 1755-1761.
- Zuk PA**, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 2001; **7**: 211-228.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények

Angol nyelven

1. V. Vas, M. Hajdu and **F. Uher**: *Alternativ views of tissue stem cell plasticity*. Haematologia 32:175-190. (2002) (IF=0,293)
2. Melinda Hajdu, Éva Puskás, Andrea Sipos, Anikó Barta, Katalin Pálóczi and **Ferenc Uher**: *Homogeneous immunoglobulins following allogeneic bone marrow transplantation*. Acta Haematol 109:124-128. (2003) (IF=1,874)
3. V Vas, Szilágyi L, Pálóczi K and **F Uher**: Soluble Jagged-1 is able to inhibit the function of its multivalent form to induce hematopoietic stem cell self-renewal in a surrogate in vitro assay. J Leukoc Biol 75:714-720. (2004) (IF=4,224)
4. Virág Vas, Roberta Fajka-Boja, Gabriela Ion, Valéria Dudics, Éva Monostori and **Ferenc Uher**: *Biphasic effect of recombinant galectin-1 on the growth and death of early hematopoietic cells*. Stem Cells 23:279-287. (2005) (IF=6,094)
5. Zsuzsanna Kertész, Virág Vas, Judit Kiss, Veronika S. Urbán, Éva Pozsonyi, András Kozma, Katalin Pálóczi, and **Ferenc Uher**: In vitro expansion of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the presence of immobilized Jagged-1 and early acting cytokines. Cell Biol Int 30:401-405. (2006) (IF=1,363)
6. Judit Kiss, Aliz Kunstár, Roberta Fajka-Boja, Valéria Dudics, József Tóvári, Ádám Légrádi, Éva Monostori, and **Ferenc Uher**: *A novel anti-inflammatory function of human galectin-1: inhibition of hematopoietic progenitor cell mobilization*. Exp Hematol 35:305-313. (2007) (IF=3,147)
7. Gergely Varga, Judit Kiss, Judit Várkonyi, Virág Vas, Péter Farkas, Katalin Pálóczi and **Ferenc Uher**: Inappropriate Notch activity and limited mesenchymal stem cell plasticity in the bone marrow of patients with myelodysplastic syndromes. Pathol Oncol Res 13:311-319. (2007) (IF=1,272)
8. Veronika S. Urbán, Judit Kiss, János Kovács, Elen Gócza, Virág Vas, Éva Monostori, and **Ferenc Uher**: *Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes*. Stem Cells 26:244-253. (2008) (IF=7,741)
9. Valéria Dudics, Aliz Kunstár, János Kovács, Tamás Lakatos, Pál Géher, Béla Gömör, Éva Monostori, and **Ferenc Uher**: Chondrogenic potential of mesenchymal stem cells from patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis – measurements in a microculture system. Cells Tissues Organs 189:307-316. (2009) (IF=3,322)
10. Horvát-Karajz K, Balogh Z, Kovács V, Drrernat AH, Sréter L, **Uher F**: In vitro effect of carboplatin, cytarabine, paclitaxel, vincristine, and low-power laser irradiation on murine mesenchymal stem cells. Lasers Surg Med. 41:463-469. (2009) (IF=2,603)
11. Beáta Hegyi, Bernadett Sági, János Kovács, Judit Kiss, Veronika S. Urbán, Gabriella Mészáros, Éva Monostori, and **Ferenc Uher**: *Identical, Similar or Different? Learning about Immunomodulatory Function of Mesenchymal Stem Cells Isolated from Various Mouse Tissues: Bone Marrow, Spleen, Thymus, and Aorta Wall*. Int Immunol 22:551-559. (2010) (IF=3,301)
12. Varga N, Veréb Z, Rajnavölgyi É, Németh K, **Uher F**, Sarkadi B, Apáti A: *Mesenchymal stem cell like (MSCl) cells generated from human embryonic stem cells support pluripotent cell growth*. Biochem Biophys Res Commun 414:474-480. (2011) (IF=2,484)

13. Bernadett Sági, Pouneh Maraghechi, Veronika S. Urbán, Beáta Hegyi, Anna Szigeti, Roberta Fajka-Boja, Gyöngyi Kudlik, Katalin Német, Éva Monostori, Elen Gócza, **Ferenc Uher**: *Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs is Determined in the Post-Segmentation Mesoderm*. Stem Cells and Development 21:814-828. (2012) (IF=4,459)
14. Beáta Hegyi, Gyöngyi Kudlik, Éva Monostori and **Ferenc Uher**: Activated T-cells and Pro-Inflammatory Cytokines Differentially Regulate Prostaglandin E2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells. Biochem Biophys Res Commun 419:215-220. (2012) (IF=2,484)

Magyar nyelven

1. **Uher Ferenc**: A haematopoeticus őssejtek eredete, fejlődése és öregedése. Orv.Hetilap 141:347-352. (2000)
2. **Uher Ferenc**: *Egy őssejt...az egy őssejt?* Orv.Hetilap 141:2085-2086. (2000)
3. **Uher Ferenc**, Puskás Éva, Torbágyi Éva, Barta Anikó és Pálóczi Katalin: *Az immunrendszer regenerációja csontvelőátültetés után*. Orv.Hetilap 142:59-65. (2001)
4. Vas Virág, Pálóczi Katalin és **Uher Ferenc**: A csontvelőátültetés után kialakuló B-sejt készlet – a korlátozott ellenanyag sokféleség molekuláris alapjai. Orv.Hetilap 142:163-167. (2001)
5. Puskás Éva, Hajdu Melinda, Sipos Andrea, Barta Anikó, **Uher Ferenc** és Pálóczi Katalin: *A csontvelőátültetés után kialakuló korlátozott ellenanyag készlet – homógen immunoglobulinok*. Orv.Hetilap 142:267-272. (2001)
6. **Uher Ferenc**: A lympho-haematopoesis molekuláris szabályozása: döntéshozó molekulák. Orvosképzés 4:244-258. (2001)
7. **Uher Ferenc** és Vas Virág: *A szöveti őssejtek plaszticitása*. Orv. Hetilap 143: 921-928. (2002)
8. Vas Virág és **Uher Ferenc**: *Őssejt heterogenitás és plaszticitás a csontvelőben*. Transzfúzió 36:19-25. (2003)
9. **Uher Ferenc**: A felnőtt őssejtek – vérképző és egyéb szöveti őssejtek. Magyar Tudomány XLX: 298-304. (2004)
10. Varga Gergely és **Uher Ferenc**: *A myelodysplasia biológiája*. Orv. Hetilap 145: 1163-1170. (2004)
11. Vas Virág, Kertész Zsuzsanna, Pálóczi Katalin és **Uher Ferenc**: *A Notch jelátviteli rendszer szerepe a vérképzés szabályozásában*. Orv. Hetilap 146:309-316. (2005)
12. Dudics Valéria, Kunstár Aliz, Géher Pál, Gömör Béla, Hangody László és **Uher Ferenc**: *A mesenchymalis őssejtek felhasználásának lehetőségei a porckárosodással járó mozgásszervi betegségek kezelésében*. Orv. Hetilap 146:1201-1208. (2005)
13. Urbán S. Veronika, Kiss Judit, Vas Virág, Kovács János és **Uher Ferenc**: *A diabetes mellitus őssejtterápiája: eredmények, lehetőségek és kérdőjelek*. Orv. Hetilap 147:791-797. (2006)
14. **Uher Ferenc**: *A haemopoeticus őssejt*. Hemat Transzf 40:182-190. (2007)
15. Kiss Judit, Urbán S. Veronika, Dudics Valéria, Vas Virág és **Uher Ferenc**: *A mesenchymalis őssejtek és az immunrendszer – immunszuppresszió gyógyszerek nélkül?* Orv. Hetilap 149:339-346. (2008)

16. **Uher Ferenc:** A mesenchymalis őssejtektől az aktivált fibroblasztokig: egy gyorsan változó sejt genetikai ujjlenyomatai. Magyar Tudomány 171:1193-1196. (2010)
17. Urbán S. Veronika, Hegyi Beáta, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, **Uher Ferenc:** *A diabetes mellitus őssejtterápiája – az endokrin pancreas regenerációja.* Diab Hung 19:279-286. (2011)
18. Hegyi Beáta, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, **Uher Ferenc:** *A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladásos- és immun-folyamatok szabályozásában.* Immunológiai Szemle (közlésre elfogadva)(2012)

Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt iskolateremtő mentoromnak, néhai **Gergely János** professzor úrnak kell megköszönnöm, hogy diákkörös hallgatóként befogadott intézetébe és közel húsz éven át folyamatosan segítette, irányította szakmai pályafutásomat. A laboratóriumi munka rejtelmeivel és buktatóival első témavezetőm **Sándor Mátyás**, jelenleg a University of Wisconsin professzora, ismertetett meg. Pályafutásom meghatározó szakasza volt az a több mint három év, amit Egyesült Államok Nemzeti Egészségügyi Intézeteiben, **Howard B. Dickler** professzor laboratóriumában tölthettem, talán itt váltam igazán kutatóvá.

2001-ben kaptam lehetőséget az Országos Haematológiai és Immunológiai Intézetben (a későbbi Országos Gyógyintézeti Központban) egy saját összejtbiológiai laboratórium kialakítására, ami jelenleg az Országos Vérellátó Szolgálat keretében működik. A disszertációban összefoglalt eredmények már itt születtek, jórészt diákkörös és doktorandusz hallgatóim - **Dudics Valéria, Hegyi Beáta, Kertész Zsuzsanna, Kiss Judit, Kudlik Gyöngyi, Kunstár Alíz, Sági Bernadett, Suhajdáné Urbán Veronika**, és **Vas Virág** - lelkes és szorgalmas munkájának gyümölcseként. Mindannyiuknak köszönettel tartozom, ugyanúgy, mint **Renner Mária** és **Ullrich Olga** asszisztenseknek, akik nélkül a csoport valószínűleg egyetlen napig sem lett volna működőképes.

Munkánk természetesen nagyban függ – és mindig is függött – azoktól a kollégáktól és barátoktól, akiknek laboratóriumával évek óta együttműködünk: **Monostori Évától** (MTA, SZBK, Genetikai Intézet), **Gócza Elentől** (gödöllői Mezőgazdasági Biotechnológiai Kutatóközpont) **Kovács Jánostól** (ELTE, Anatómiai, Sejt- és Fejlődésbiológiai Tanszék) és **Német Katalintól** (OVSZ, Génterápiás Laboratórium). Köszönöm nekik.

Végül köszönettel tartozom **édesanyámnak**, aki nem csak felnevelt és féltő szeretettel kísérte pályámat, de olyan középiskolába küldött – a Pannonhalmi Bencés Gimnáziumba – ahol egy életre szóló hitet és emberi tartást kaptam tanáraimtól.