

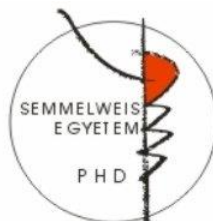
A mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitása

Doktori tézisek

Kudlik Gyöngyi Andrea

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Uher Ferenc, az MTA doktora, kutató professzor

Hivatalos bírálók: Dr. Pállinger Éva, Ph.D., egyetemi docens

Dr. László Lajos, a biológia tudomány kandidátusa,
egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, az MTA doktora egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens

Dr. Molnár Kinga, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2017

BEVEZETÉS

A mesenchymalis őssejtek (MSC-k) a szöveti őssejtek közé tartoznak, és szinte bármely szervből/szövetből izolálhatók. Feladataik közé tartozik a szervezetben zajló regeneratív folyamatok és a vérképzés támogatása, valamint az immunfolyamatok szabályozása. Definiálásuk kizárólag MSC-kre jellemző markerek hiányában hárompontos kritériumrendszer alapján zajlik, ezek humán MSC-k esetében a következők: 1.) standard kultúra körülmények között – azaz 10% borjúsavot tartalmazó tápfolyadékban – a tenyésztőedény falához tapadva képesek növekedni és elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutatnak; 2.) a CD105, CD73, CD90 markereket kifejezik sejtfelszínükön, míg negatívak a különböző vérsajtfejlődési sorokra és endotél sejtekre jellemző markerekre, úgymint: CD45, CD34, CD14 vagy CD11b, CD79 α vagy CD19 és HLA-DR; valamint 3.) képesnek kell lenniük megfelelő körülmények között oszteoblasztok, adipociták és kondroblasztok létrehozására, *in vitro*.

Az MSC-k terápiás haszna egyrészt annak köszönhető, hogy a szöveti sérülés jeleire válaszul regenerációt segítő növekedési faktorokat, citokineket, egyéb szolubilis faktorokat, extracelluláris vezikulákat képesek nagy mennyiségben termelni, így támogatva a gyulladásgátló immunfolyamatokat és a sérült szövetek regenerációját. Másik kiemelkedő tulajdonságuk, hogy gyakorlatilag az összes immunsejttel képesek kapcsolatot teremteni, és ezáltal az immunfolyamatokat gyulladásgátló irányba befolyásolni. Ehhez azonban a gyulladással szemben aktíváló jelei szükségesek, az MSC-knek önmagukban nincs jelentős immunosuppresszív hatásuk. Immunelnyomó aktivitásuk többféle mediátoron keresztül valósul meg, a pontos hatásmechanizmusok azonban máig nem tisztázottak, sok az egymásnak ellentmondó kísérleti adat. Számos MSC-k által termelt szolubilis faktor szerepe igazolódott a folyamatban, ilyen a prosztaglandon-E2 (PGE-2), különböző citokinek (hepatocita növekedési faktor, transzformáló növekedési faktor β), a tumor nekrozis faktor stimulált gén 6 fehérje, a nitrogén-monoxid (NO), az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO), és a szolubilis humán leukocita antigén G (HLA-G) molekulák, míg számos munka mutatta ki bizonyos sejt-sejt kontaktust létrehozó molekulák szerepét is, úgymint a B7-H1 (PD-L1), B7-H4, a Notch receptorok vagy a Jagged1.

Az MSC-k képesek gátolni az aktivált T-sejtek osztódását és citokintermelésüket is befolyásolják. Az aktivált T-sejtek (és szintén jelen lévő monociták, makrofágok, NK-sejtek) gyulladással szemben citokineket termelnek – például IFN γ -t, tumor nekrozis faktor alfát (TNF α) és/vagy IL-1 β -t, majd ezek hatására az MSC-k több, a T-sejt osztódás gátlásáért felelős faktort szekretálnak (pl. PGE-2,

NO). Erre válaszul a T-sejtek citokintermelése a gyulladáshoz vezető faktorok (IFN γ , TNF α , IL-6 és IL-17) felől a gyulladásgátló molekulák felé (IL-4 és IL-10) tolódik. Az itt felsorolt mediátorok pontos szerepe azonban máig sem tisztázott, sok az egymásnak ellentmondó adat, ami valószínűleg a sokszor igen eltérő kísérleti körülményekre vezethető vissza. Mára már az is egyértelmű, hogy az MSC-k mind a naív és memória T-sejtek, mind a CD4 és CD8 pozitív T-sejtek osztódását képesek gátolni.

Az MSC-k és makrofágok (M ϕ -ok) egymásra hatásáról már jóval kevesebbet tudunk. A közelmúltban publikált kisszámú vizsgálat alapján feltételezik, hogy az MSC-k képesek a M ϕ -ok úgynevezett gyulladásgátló („alternatív” úton aktivált) M2-es M ϕ -profilba történő polarizációját előidézni, ide tartoznak a szövetregenerációt segítő, sebgyógyító M2a és a gyulladásgátló, regulátor funkciókkal rendelkező M2b M ϕ -ok. Maggini és munkatársainak eredményei szerint a bakteriális lipopoliszachariddal (LPS-sel) gyulladáskeltő („klasszikus”) M1-es állapotba juttatott M ϕ -ok citokintermelése az MSC-k hatására az M2-es (gyulladásgátló/ szövetregeneráló) M ϕ -ok citokintermeléséhez vált hasonlóvá, vagyis a gyulladáshoz vezető mediátorok (TNF α , IL-6, IL-12p70, IFN γ) szintje csökkent, míg a gyulladásgátló IL-10, illetve IL-12p40 mennyisége emelkedett a kultúrák felülszóiban. Az eddig elvégzett kisszámú vizsgálatban azonban nem különböztetik meg, hogy az MSC-k az M2 fenotípuson belül pontosan milyen aktivációs állapotot (pl. M2a vagy M2b) idéznek elő a M ϕ -oknál, pedig ennek ismeretében célzottabbá tehető az MSC-k terápiás felhasználása, ugyanis bizonyos gyulladáshoz és/vagy autoimmun betegségekből más-más M ϕ alpopulációk jelenthetnek problémát.

CÉLKITŰZÉSEK

Jelen munkánkban a következő kérdések megválaszolása volt a cél:

1. Létre tudunk-e hozni C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből a mesenchymalis őssejtekkel szemben támasztott kritériumoknak megfelelő őssejtkultúrákat?
2. Igazolni tudjuk-e az így létrehozott MSC-k immunszuppresszív aktivitását mitogén és alloantigén-indukált T-sejtes rendszerekben?
3. Milyen fő, az MSC-k által termelt immunszuppresszív molekulák felelősek a megfigyelt immunszuppresszív hatásért?
4. Miként befolyásolják a főbb gyulladásos citokinek – a TNF α és az IFN γ – az MSC-k PGE-2-termelését?
5. Az aktivált MSC-k PGE-2-termelése milyen molekuláris mechanizmus útján valósul meg?
6. Az MSC-k jelenlétében hogyan változik a különbözőképpen aktivált peritoneális M ϕ -ok fagocitotikus és antigénprezentáló képessége, valamint citokintermelése – tehát aktivációs profilja?
7. Sikeresen létre tudunk-e hozni egér csontvelői sejtekből differenciáltatott M ϕ -okat, valamint létre tudjuk-e belőlük hozni megfelelő induktorok használatával a legismertebb M ϕ aktivációs állapotokat: M1, M2a, M2b?
8. Hogyan befolyásolják az MSC-k az M1, M2a és M2b induktív környezetben a csontvelői M ϕ -ok fagocitotikus képességét és citokintermelését?
9. Képesek-e a csontvelői M ϕ -ok az induktív környezet változását követve újraperarizálódni, valamint befolyásolni tudja-e a folyamatot az MSC-k jelenléte?
10. Milyen fő mediátor felel az MSC-k M ϕ -okra gyakorolt hatásáért?

MÓDSZEREK

A mesenchymalis őssejtek izolálása és tenyésztése

A csontvelői MSC kultúrák létrehozása főként adherenciájuk alapján történt. Röviden: a 10-12 hetes C57Bl/6-os egerekből preparált combcsontokból kifűjtük a csontvelőt, az így kapott sejteket tenyésztőedényekbe szélesztettük. A tenyésztési médium (KM) összetétele: DMEM/F-12 médium (1:1 arányú keverék) kiegészítve 10 v/v%-os FBS-sel, 5 v/v% lósavóval, 2 mM L-glutaminnal, 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel. A tenyészeteket 37°C-on 5% CO₂-t biztosító termosztátban inkubáltuk. Az MSC-eket a 7. és 15. átoltás között használtuk.

T-sejtek tisztítása

A T-sejtek szeparálását felnőtt C57Bl/6 egerek lépéből végeztük a SpinSep Mouse CD3⁺ T Cell Enrichment kit segítségével végeztük a cég által előírt módon. A preparátum tisztaságát CD3-specifikus monoklonális ellenanyaggal áramlási citométerben ellenőriztük.

Peritoneális- és csontvelői makrofágkultúrák alapítása

A peritoneális makrofágokat (Pe-Mφ) 10-12 hetes C57Bl/6-os egerekből nyertük a peritoneális üreg többszöri átmosásával (heparinos (10 NE/ml) Hanks-féle oldattal). A sejtuszuspenziót (PEC) kitapasztottuk, 1 óra inkubáció után a nem adherens sejteket egyszerű mosással távolítottuk el, a sejteket lósavómentes CM-ban tenyésztettük. A kísérletekhez frissen izolált Pe-Mφ-okat használtunk.

A csontvelői makrofágokat (BM-Mφ) 4-8 hetes C57Bl/6-os egerek femurjaiból kifűjt csontvelői sejtekből differenciáltattuk. 50 ng/ml M-CSF tartalmú lósavót nem tartalmazó KM-ban 5% CO₂ mellett 37°C-on 7 napig inkubáltuk a sejteket, majd egy napig lósavómentes KM-ben pihentettük őket. Minden kísérlethez frissen differenciáltatott sejteket használtunk.

A felhasznált sejtek karakterizálása

Az MSC-k, Pe- és BM-Mφ-ok karakterizálását az „Eredmények” fejezetben feltüntetett sejtfelületi markerek ellenanyaggal történő jelölésén keresztül áramlási citométerrel végeztük.

Az MSC-k csont irányú differenciálathoz a sejteket β-glicerofoszfát (10 mM), dexametazon (10⁻⁸ M) és aszkorbinsav (0,3 mM) tartalmú, 10% FBS-sel

kiegészített DMEM médiumban 2 hétig inkubáltuk. A sejtek által termelt, majd lerakódott extracelluláris kalciumot alizarinvörös festékkel mutattuk ki. A zsírsejt irányú differenciálthatáshoz a tenyésztésnél használt, de lósavót itt nem tartalmazó KM-ot egészítettük ki dexametazonnal (10^{-7} M) és 3-izobutil-1-metilxantinnal (0,5 mM), majd a sejteket 2 hétig inkubáltuk ebben. A sejtek által felhalmozott lipidcseppeket olajvörös festékkel tettük láthatóvá.

Aktivált T-sejtek osztódásának gátlása

Az MSC-k immunzsuppresszív aktivitásának méréséhez 2×10^4 MSC-t és 2×10^5 lépsejtet vagy T-sejtet adtunk 5 $\mu\text{g/ml}$ concanavalin A (ConA) jelenlétében illetve hiányában.

A kevert limfocita kultúrákat (MLR) hasonló körülmények között, 2×10^5 „válaszó” (C57Bl/6) és 2×10^5 „stimulátor” (30 Gy-vel besugárzott Balb/c) lépsejt összemérésével, szintén 2×10^4 MSC jelenlétében készítettük lósavómentes KM-ban. A mitogén (ConA) stimulált kultúrák esetében két, a kevert limfocita kultúrák esetében négy nap inkubáció után 1 μCi ^3H -timidinnel 6-12 órán keresztül jelöltük a sejteket, learattuk őket és folyadékszintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot.

A sejtkontaktus szerepének vizsgálatokor 2×10^5 MSC kultúráihoz 2×10^6 T-sejtet adtunk. A T-sejteket direkt, vagy 1 μm pórusátmérőjű féligáteresztő hártával ellátott „transwell” kamrákban adtuk a kultúrákhoz.

Sejtfelülúszókba szekretált citokinek mérése

A különböző kísérleti elrendezésekből gyűjtött sejtfelülúszókból enzimhez kötött immunoszorbens analízis (ELISA) segítségével mutattuk ki a minket érdeklő fehérjék, mediátorok mennyiségét.

Az MSC-k prosztaglandin-E2-termelésének vizsgálata

2×10^5 MSC-t tapasztottunk 24 órán keresztül 37°C -on, majd a kultúrákhoz 10 vagy 50 ng/ml TNF α -t, 20 vagy 100 ng/ml IFN γ -t, 10 μM indometacint (Indo), 1mM N-metil-L-arginin-acetátot (L-NMA), 1 μM metil-triptofánt (1-MT) vagy 80 μM nitrogén-monoxid donor molekulát (NOC-18) adtunk. További 48 óra inkubáció után felülúszókat gyűjtöttünk.

Makrofágok különböző aktivációs profilba történő indukciója

A Pe-M ϕ -ok aktivációját vagy 10 μ g/ml lipopoliszachariddal (LPS), vagy M1 indukciós médiummal (lásd később) érték el. 10^6 PEC-et tapasztottunk ki, majd a mosás után megmaradt sejteket használtuk (lásd fentebb), amiket 2×10^4 MSC-vel kezeltünk.

A BM-M ϕ -ok indukciójához csontvelősejteket (2×10^5 sejt/lyuk) tapasztottunk, majd a fentebb ismertetett eljárás szerint differenciáltattuk őket. Ezután az M1, M2a és M2b aktivációs állapotok kiváltásához a következő kórtételeket használtuk: 1.) M1 indukciós médium: 100 ng/ml LPS + 10 ng/ml IFN γ lósavómentes KM-ban; 2.) M2a indukciós médium: 20 ng/ml IL-4 lósavómentes KM-ban; 3.) M2b indukciós médium: 100 ng/ml LPS + 100 μ g/ml hőaggregált egér IgG (IgGa) lósavómentes KM-ban. Az indukció 2×10^4 MSC jelenlétében vagy hiányában zajlott.

M ϕ -ok élesztő- és apoptotizáló timocita fagocitózisának vizsgálata

Az apoptotizáló timociták létrehozásához 6-8 hetes C57Bl/6 egerek tímuszát izoláltuk, majd szétnyomkodtuk a szervet. A kapott sejtszuspenziót 2 μ M dexametazonnal kezeltük 12 órán át 37°C-on.

A Pe-M ϕ -okhoz, vagy BM-M ϕ -okhoz MSC-eket, LPS-t, M1-, M2a- vagy M2b indukciós médiumot adtunk. 48 órás 37°C-on történő inkubáció után 5×10^6 hőinaktivált élesztősejtet (*Saccharomyces cerevisiae*) adtunk a kultúrákhoz, majd egy órát inkubáltuk őket 37°C-on. Ezután a sejteket fixáltuk és Giemssal festettük. Az eredményeket digitális fényképeken rögzítettük (random képeken), majd megszámloltuk a bekebelezett élesztősejtek mennyiségét (élesztősejt/makrofág) kezelésként 100-100 makrofágban.

A Pe-M ϕ -ok apoptotizáló timocita-fagocitózist specifikus 5(6)-CFDA/SE fluoreszcens jelöléssel bizonyítottuk, ami a 6-8 hetes C57Bl/6 egerek tímuszából izolált sejtekben CFSE-vé (karboxifluoreszcein-diacetátszukcinimidil-észter) alakul. A jelölt timocitákat 12 órán át 37 °C-on inkubáltuk 2 μ M dexametazon jelenlétében, majd a kultúrákhoz adtuk. Az MSC-k az mCherry génjének lentivirális bevitelével lettek jelölve (Dr. Német Katalin és munkatársainak segítségével). 5×10^5 CFSE-jelölt timocitát és 2×10^4 mCherry fluoreszcens fehérjét expresszáló MSC-t adtunk a 10^6 kiindulási sejtszámmal kitapasztott Pe-M ϕ kultúrákhoz, majd 48 órán át inkubáltuk a sejteket. Az eredményeket digitális fényképeken rögzítettük, valamint áramlási citométerrel is vizsgáltuk az apoptotizáló sejtek felvételét. Egyes kísérletekben jelöletlen apoptotizáló timocitákat, vagy hőinaktivált élesztősejteket

alkalmaztunk, és az egy órás fagocitózis után inkubáltuk a sejteket még 48 órán át, hogy citokinanalízis céljából felülúszókat gyűjtsünk.

A Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességének vizsgálata MSC-eket és T-sejteket tartalmazó kultúrákban

4×10^3 MSC-t, 2×10^5 PEC-ből nyert Pe-M ϕ -ot, 2×10^5 *in vivo* komplett Freund adjuváns és ovalbumin 1:1 arányú keverékével előaktivált T-sejtet, valamint ovalbumin (OVA) különböző koncentrációit (4; 20; 100 $\mu\text{g/ml}$) mértük össze, majd a kultúrákat 37°C -on 5 napig inkubáltuk. Ezt követően 1 μCi ^3H -timidin hozzáadásával 18 órán keresztül jelöltük a sejteket, és folyadék-szcintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot.

A különböző T-sejt alpopulációkban bekövetkező változások vizsgálata

Ehhez a vizsgálathoz 4×10^3 MSC-t, 2×10^5 PEC-ből nyert Pe-M ϕ -ot, 2×10^5 *in vivo* ovalbuminnal előaktivált T-sejtet, valamint 20 $\mu\text{g/ml}$ ovalbumint mértünk össze, majd a kultúrákat 5 napig inkubáltuk 37°C -on. Ezután a kultúrákból begyűjtöttük a T-sejteket és a Treg-sejtek jelölését a Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #1 segítségével, míg a T helper 17 limfociták meghatározását a Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit leírása szerint végeztük. A jelölt sejtek arányát áramlási citométerrel mértük.

A sejtkontaktus szerepének vizsgálata BM-M ϕ és MSC kokultúrákban

2×10^5 BM-M ϕ -ot szélesztettünk, majd 2×10^4 MSC-t helyeztünk 1 μm porúsátmérőjű féligáteresztő hárttyával ellátott „transwell” kamrákba. A kialakított kokultúrákat M1-, M2a- vagy M2b indukciós médiummal kezeltük, majd 48 órán át inkubáltuk és felülúszókat gyűjtöttünk.

A prosztaglandin-E2 szerepének vizsgálata BM-M ϕ kultúrákban

A PGE-2 szintézisének megakadályozásához COX-1-gátlóként 10 μM Resveratrolt és/vagy COX-2-gátlóként 10 μM Celecoxibot adtunk M2b indukciós médiumot tartalmazó BM-M ϕ -ok és MSC-k kokultúráihoz. 48 órás inkubáció után felülúszókat gyűjtöttünk. A külső forrásból adagolt PGE-2-t felhasználó kísérletekben 200, 400 vagy 800 pg/ml PGE-2-t adtunk az M2b indukciós médiumot tartalmazó BM-M ϕ kultúrákhoz. 48 órás inkubációt követően felülúszókat gyűjtöttünk.

Statisztikák

Az eredmények szignifikáns voltát Student-féle t-próba, és nem-paraméteres Kruskal-Wallis próba segítségével ellenőriztük $p < 0,05$ figyelembe vételével.

EREDMÉNYEK

A csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek karakterizálása

Munkánk első lépéseként elengedhetetlen volt bizonyítani, hogy a 10-12 hetes egerek csontvelőjéből alapított sejtenyészetek megfelelnek-e a mesenchymalis őssejtekkel szemben állított követelményeknek. Az adherens sejtek elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutattak, amit Giemsa-festéssel tettünk láthatóvá. Adherens sejteink sejtfelszíni markerprofilja MSC-kre jellemző képet mutatott. Megfelelő mennyiségben hordoztak egér fibroblasztokra jellemző markereket, úgymint Sca-1, CD44, CD73. Az általunk vizsgált kultúra már nem tartalmazott hematopoetikus elemeket (CD34, CD45R, CD11b, Gr1, Ter117). Ezek után a csontvelői kultúrákból speciális induktorok használatával 14 nap alatt sikeresen differenciáltunk lipidcseppeket felhalmozó zsírsejteket, és extracellulárisan kalciumot felhalmozó oszteoblasztokat. Differenciációs képességeiket tekintve tehát sejteink multipotensnek tekinthetők (vagy legalábbis bipotensek).

Csontvelői MSC-k immunzuppresszív aktivitásának vizsgálata T-sejtes rendszerekben

A csontvelői MSC-k immunzuppresszív aktivitásának bizonyítására kétféle aktivált T-sejtes rendszerben végeztünk vizsgálatokat. Kevert limfocita reakció során (MLR, mixed lymphocyte reaction) az alloantigén-indukált T-sejt osztódásgátlást különböző mennyiségű MSC hozzáadására vizsgáltuk. 2×10^5 „válaszadó” (C57Bl/6-os egerekből származó, osztódóképes) és ugyanennyi „stimulátor” (Balb/c egerekből izolált, besugárzott, osztódásképtelen) lépsejtet adtunk MSC-k $1,25 \times 10^3$, $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , 10^4 , illetve 2×10^4 sejtet tartalmazó kultúráihoz. A T-sejtek proliferációját ^3H -timidinbeépülés mértékének változásával követtük nyomon. Eredményeinkből kiderült, hogy az MSC-eket 1:40 arányban alkalmazva azok már jelentős mértékben képesek gátolni az alloantigén-indukált T-sejtosztódást, a gátlás maximumát pedig 1:20 MSC:T-sejt aránynál tapasztaltuk. A kísérletet mitogénindukált T-sejtes rendszerben, $5 \mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (ConA)

jelenlétében is megismételtük, és hasonló trendeket figyelhettünk meg. A továbbiakban már csak mitogénindukált T-sejtekkel és 1:20 MSC:T-sejt aránnyal dolgoztunk.

Az MSC-k T-sejtosztódást gátló hatásában szerepet játszó mediátorok vizsgálata

Szerettük volna kideríteni, hogy az egér MSC-k és aktivált T-sejtek között kialakuló kölcsönhatásért milyen szolubilis mediátor(ok) felel(nek). A PGE-2 termelésben szerepet játszó enzimek, a ciklooxygenázok (COX-1, COX-2) gátlószereként indometacint (Indo), az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO) gátlószereként 1-metil-triptofánt (1-MT), valamint a nitrogén-monoxid (NO) szintéziséért felelős indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) gátlószereként N-metil-L-arginin-acetátot (L-NMA) adtunk MSC-k és ConA-stimulált T-sejtek különböző kultúráihoz. Az MSC-k erőteljes T-sejtproliferációt gátló hatása megint kialakult. Ezt a gátló hatást az Indo és L-NMA gátlószerek voltak képesek részlegesen feloldani, hatásuk azonban nem volt additív. A prosztaglandinok és a NO hatása tehát igazolódott az MSC-k és aktivált T-sejtek kölcsönhatásában. Azonban az is kiderült, hogy szerepük nem kizárólagos, együttes gátlásuk is csak részlegesen tudta helyreállítani az aktivált T-sejtek osztódását. Az 1-MT hatása, tehát az IDO szerepe vizsgálataink szerint nem volt kimutatható.

A prosztaglandin E2 termelésének vizsgálata aktivált T-sejtek és MSC-k kokultúráiban

Miután a PGE-2 MSC–T-sejt kölcsönhatásban betöltött szerepe a mi méréseink alapján is beigazolódni látszott, szerettük volna megvizsgálni, hogyan alakul az MSC-k PGE-2 termelése aktivált T-sejtek jelenlétében. Méréseink alapján az MSC-k önmagukban átlagosan 1150 pg/ml PGE-2-t termeltek (kontroll). Ez az érték már aktiválatlan T-sejtek jelenlétében is körülbelül négyszeresére ugrott, azonban a ConA-val aktivált T-sejteket tartalmazó kokultúrákban volt a legmagasabb (kb. tízszerese a kontroll kultúráénak). Ha a két sejttípus között a fizikai kontaktust féligáteresztő hártáival megszüntettük, akkor a T-sejtek sem önmagukban, sem aktivált állapotukban nem voltak képesek előidézni a felülúszókban mérhető PGE-2 szint emelkedését. Tehát az aktivált T-sejtek képesek fokozni az MSC-k PGE-2-szintézisét, azonban ehhez a kétféle sejtnak direkt kontaktusba kell kerülnie egymással. Az aktivált T-sejtek PGE-2-növelő hatását gátlószerek jelenlétében is vizsgáltuk. Nem meglepő módon Indo hozzáadására a PGE-2 termelés erőteljesen lecsökkent, az L-NMA jelenlétében azonban nem

figyeltünk meg gátló hatást. Az aktivált T-sejtek PGE-2 növelő hatása tehát döntően a COX enzimeken keresztül, és nem az iNOS és így a NO igénybevételével valósul meg.

A mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2-termelésének hatásmechanizmusa gyulladásoos citokinek jelenlétében

Szerettük volna felderíteni az MSC-k PGE-2-termelésének növekedése mögött húzódoo mechanizmust. Ehhez a gyulladásoos környezetet a T-sejtek által is termelt legfontosabb citokinekkel, interferon-gamma (IFN γ) és tumor nekrozis faktor-alfa (TNF α) hozzáadásával modelleztük. A TNF α magasabb koncentrációban (50 ng/ml) képes volt jelentősen fokozni az MSC-k PGE-2-termelését, míg alacsonyabb koncentrációnál (10 ng/ml) ez a hatás elmaradt. Az IFN γ sem magasabb (100 ng/ml), sem alacsonyabb (20 ng/ml) koncentrációban nem befolyásolta a PGE-2-termelést, azonban ha azt TNF α egyidejű hozzáadása mellett alkalmaztuk, a hatás nem additív volt, hanem szinergisztikus: az IFN γ még alacsony koncentráció mellett is a TNF α hatását potenciálva sokszorosára növelte a PGE-2 felülúszókban mérhető szintjét. Az IFN γ tehát jelentős mértékben képes fokozni az MSC-k TNF α -indukált PGE-2-szintézisét.

Ezek után a PGE-2-termelés jelátviteli útjában feltételezhetően szerepet játszó enzimek (COX enzimek és iNOS) gátlószereit adtuk az előbb ismertetett rendszerhez. Az MSC-k alap PGE-2-termelése Indo hatására szinte teljesen megszűnt (85%-os gátlás), az iNOS-gátló L-NMA viszont az Indo-nál gyengébb mértékben ugyan (mintegy 60%-ban), de szintén képes volt mérsékelni a mediátor szintézisét. Ezután az MSC-k 50 ng/ml TNF α -val indukált PGE-2-termelését kontrollnak véve megfigyeltük, hogy az Indo megint erős szintézisgátlónak bizonyult (65%-os eredményesség). Ebben az aktivált állapotban viszont már az L-NMA nem tudta befolyásolni az MSC-k PGE-2-szintézisét. A TNF α tehát valószínűleg egy külön reakcióúton, az iNOS-tól függetlenül, de a COX enzimeken keresztül indukál PGE-2 szintézist. Mikor a TNF α -t az IFN γ -val együtt alkalmaztuk, akkor már az L-NMA is kifejti gátló hatását, azonban soha nem éri el az Indo okozta gátlás erősségét. Ez arra utal, hogy az IFN γ viszont egy olyan jelátviteli úton kapcsolódik be – szintén a COX enzimeken keresztül – a PGE-2-szintézis szabályozásába, amelynek az iNOS enzim is fontos résztvevője. Ezt támasztja alá az az eredményünk is, hogy a NOC-18-cal, egy NO-donorral kezelt MSC-kból szintén jelentős mennyiségű PGE-2 szabadul fel.

Mesenchymalis őssejtek és peritoneális makrofágok kölcsönhatásának vizsgálata

A peritoneális makrofágok karakterizálása

Munkánk további részében a gyulladáso és/vagy autoimmun betegségek háttérében álló másik, központi sejtfeleségre, a makrofágokra fókuszáltunk, és szerettük volna kideríteni, hogyan befolyásolják az MSC-k ezeket a sejteket. A „Módszerek” fejezetben ismertetett módon izolált, letapadt sejteket áramlási citometriával jellemeztük. A sejtek 49,6±7,3%-ban tartalmaztak érett makrofágokat (F4/80 marker alapján), amiből 48,8±6,3% hordozott CD11b monocita-makrofág markert. Ezenkívül főként CD19⁺ B-sejteket és kisebb mennyiségben CD3⁺ T-sejteket detektáltunk, míg granulociták nem voltak kimutathatók a kultúrákban. A vizsgált sejtek 69,8±5,4%-ban hordoztak MHC-II antigént, valamint 12,8±2,3%-ban Ly-6c-t. Mindkét marker a Mφ-ok aktiváltságára utal, azonban az MHC-II⁺ sejtek kisebb hányadát a detektált B-sejtek teszik ki (26.5±4.4%).

A peritoneális makrofágok élesztő- és apoptotizáló timocita-fagocitózisának változása MSC-k jelenlétében

Az általunk alkalmazott módszerrel létrehozott kultúrákban a Pe-Mφ-ok jelentős mértékben voltak képesek élesztő sejteket fagocitálni, tehát funkcionálisan megfelelő Mφ-okat tudunk izolálni. Az MSC-k jelenléte nagymértékben tudta fokozni a Pe-Mφ-ok élesztő-fagocitózisát. LPS-sel, egy Toll-like receptor 4 (TLR4)-liganddal a Mφ-ok további aktivációját érhetjük el. Méréseink szerint a 10μg/ml-rel történő LPS-kezelés nagymértékben csökkentette a Pe-Mφ-ok élesztő-fagocitózisát, míg az MSC-k jelenléte jelentősen fokozta azt. Az MSC-knek ezt a hatását az LPS jelenléte nem befolyásolta. A patogének internalizációjának vizsgálata után kíváncsiak voltunk, hogy miként befolyásolja az MSC-k jelenléte a Pe-Mφ-oknál a pusztuló saját sejtek fagocitózisát. Az apoptotikus sejtek felvételét fluoreszcens festékkel (CFSE) jelölt, és előzetesen dexametazonnal kezelt timociták segítségével bizonyítottuk a kokultúrákban. Fluoreszcens mikroszkópos képeink és áramlási citometriás méréseink szerint is megtörtént az apoptotizáló sejtek felvétele: a közepes fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékek szerint ugyanis a szabad timociták fluoreszcens jele a Pe-Mφ-ok jelenlétében jelentősen csökkent. MSC-k jelenlétében a Pe-Mφ-ok általánosan több apoptotizáló timocitát internalizáltak, ezeknek egy jelentős hányada pedig kifejezetten erős zöld fluoreszcens jelet adott, ami még több timocita bekebelezésére utal. A Pe-Mφ-ok tehát intenzívebb patogén- és apoptotizáló saját sejt felvételre képesek MSC-k jelenlétében.

Azt is szeretettük volna tudni, hogy milyen változások zajlanak le a M ϕ -ok citokintermelésében, miközben a kétféle sejtet (élesztőt vagy apoptotizáló timocitát) felveszik. A változások követésére a TNF α (egy gyulladáscsökkentő citokin), az IL-10 (egy gyulladásgátló citokin), és a PGE-2 (az MSC-T-sejt kölcsönhatásban általunk már vizsgált immunmoduláló lipid mediátor) mennyiségét mértük a felülúszókban. A Pe-M ϕ -ok citokintermelése MSC-k jelenlétében átfordult: több IL-10-et termeltek, mint TNF α -t akár élesztő sejtek, akár apoptotizáló timociták aktiváltak közben a M ϕ -okat. Tehát az MSC-k jelenléte gyulladásgátló citokinprofilhoz hozta létre a Pe-M ϕ kultúrákban, és a PGE-2 az IL-10 mennyiségével együtt mozogva valószínűleg fontos mediátora ennek a folyamatnak.

A gyulladáscsökkentő környezet hatása a peritoneális makrofágok és MSC-k kölcsönhatására

A gyulladáscsökkentő (M1) makrofágok polarizációjának két fontos induktora az LPS és az IFN γ , így kíváncsiak voltunk, hogy az ilyen módon aktivált M ϕ -ok hogyan reagálnak az MSC-k közelségére. A Pe-M ϕ -MSC kokultúrákat M1 indukciós koktéllal kezeltük. Az M1-indukció hatására a csak Pe-M ϕ -okat tartalmazó kultúrákban gyulladáscsökkentő profil kialakulását figyelhettük meg, amit a TNF α és IL-10 emelkedett szintje jelez erőteljes TNF α -dominanciával. Az MSC-k jelenléte mind a normál médiumban, mind az M1-induktív környezetben inkubált Pe-M ϕ -oknál IL-10-domináns citokintermelést eredményezett, miközben az M1-indukció alatt kialakuló TNF α -termelést nem befolyásolta. Tehát az MSC-k a Pe-M ϕ -ok IL-10-termelésének fokozásán keresztül képesek ellensúlyozni az általunk használt gyulladáscsökkentő profil indukáló faktorok hatását.

Az MSC-k hatása a makrofágok antigénbemutató képességére

A Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességét először LPS-sel történő aktiváció során követtük nyomon. Eredményeink szerint a Pe-M ϕ -ok LPS-stimulusra nagyobb százalékban váltak antigénprezentálásra alkalmas sejtékké, egyrészt az MHC-II⁺ és CD86⁺ sejtek száma dúsult a kultúrákban, másrészt a molekulák mennyisége is nőtt a sejtek felszínén. MSC-k hatására mind az aktiválatlan, mind az LPS-sel stimulált Pe-M ϕ -ok felszínén nagymértékben dúsult az MHC-II és CD86 molekula. Tehát az MSC-k jelenléte LPS-től független módon mind a „nyugvó”, mind az aktivált Pe-M ϕ -ok esetében intenzívebb antigénbemutató képességet tesz lehetővé.

A Pe-M ϕ -ok antigénprezentáló képességét ovalbumin- (OVA-) specifikus T-sejtek osztódásának mérésén keresztül vizsgáltuk tovább az OVA különböző koncentrációinak (4 $\mu\text{g/ml}$; 20 $\mu\text{g/ml}$; 100 $\mu\text{g/ml}$) jelenlétében. Eredményeink szerint már 20 mg/ml -es OVA-koncentrációnál jelentősen fokozódott az OVA-specifikus T-sejtek osztódása a Pe-M ϕ kokultúrákban, tehát a Pe-M ϕ -ok hatékony antigénprezentáló sejteknek bizonyultak. Az OVA-specifikus T-sejtek osztódása azokban a kultúrákban volt a legjelentősebb, amikben az OVA hozzáadásakor Pe-M ϕ -ok és MSC-k is jelen voltak, ilyenkor a T-sejtek dózifüggő módon az OVA magasabb koncentrációira kifejezettebb osztódással reagáltak. Az MSC-k jelenléte tehát nagymértékben fokozta a Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességét.

Kíváncsiak voltunk, hogy eközben hogyan alakul a regulátor T-sejtek és a gyulladási folyamatokban szerepet játszó 17-es típusú helper T-sejtek (Th17) aránya. Azt tapasztaltuk, hogy az MSC-eket és Pe-M ϕ -okat tartalmazó kultúrákban a CD4⁺CD25⁺ sejtek között dúsult a regulátor (FOXP3⁺) T-sejtek száma a csak Pe-M ϕ -okat tartalmazó kultúrákhoz képest. Ezzel párhuzamosan a Th17-es sejtek aránya csökkent. Az MSC-k tehát egyrészt fokozzák az immunválaszt szabályozó CD4⁺ sejtek regulátor T-sejt irányú differenciálódását, ugyanakkor gátolják az erősen autoreaktív, gyulladáskeltő Th17-es sejtek kialakulását.

Mesenchymalis őssejtek és „naiv” makrofágok kölcsönhatásának vizsgálata

A csontvelői eredetű makrofágok karakterizálása

Az MSC-k és M ϕ -ok kölcsönhatását szerettük volna behatóbban vizsgálni. Ehhez arra volt szükségünk, hogy a Pe-M ϕ -oknál tisztább, homogénebb és aktiválatlan sejtekkel dolgozzunk. 4-8 hetes C57Bl/6-os egerek csontvelőiből differenciáltattunk M ϕ -okat (BM-M ϕ). Ezzel a módszerrel $98 \pm 0,6\%$ -os tisztasággal tudtunk létrehozni naiv, aktiválatlan (MHC-II^{Ly-6c}⁻) F4/80-at kifejező érett M ϕ -okat (F4/80⁺CD11b⁺).

A különböző irányokban aktivált csontvelői makrofágok élesztő-fagocitózisának változása MSC-k jelenlétében

Ezek után a BM-M ϕ -ok fagocitotikus képességét vizsgáltuk. Nyugvó, naiv (M0) állapotban vagy speciális induktorok segítségével a három főbb, ismert M ϕ aktivációs profilt polarizálva (M1 - gyulladási, M2a – sebgyógyító és M2b – regulátor) mértük a BM-M ϕ -ok élesztő-fagocitózisát. A nyugvó sejtek önmagukban átlagosan 12 élesztő sejtet vettek fel, ami M2a induktív környezetben sem változott számottevően. Az M1-es és M2b M ϕ -ok viszont jelentősen kevesebb élesztőt tudtak

bekebelezni. Az MSC-k jelenléte különbözőképpen befolyásolta az egyes aktiváltsági állapotokban lévő BM-M ϕ -ok élesztő-fagocitózist: M0 és M2a állapotokban csökkentette, míg M1 és M2b aktivációs környezetben jelentősen növelte annak mértékét.

A különböző irányokban aktivált csontvelői makrofágok citokintermelése MSC-k jelenlétében

A fagocitotikus képesség vizsgálatával párhuzamosan szeretnénk volna tudni, a különböző induktorok valóban kialakítják-e a megfelelő M ϕ -polarizációs állapotokat (M1, M2a és M2b), illetve hogy az MSC-k hogyan befolyásolják az indukciókor kialakuló citokinprofil. Ezt a TNF α , IL-10 és a kitináz-3-szerű fehérje 3 (Ym1) – rendszerünkben a M ϕ -ok által termelt – faktorok sejtfelülűsókban mérhető szintjének vizsgálatán keresztül szeretnénk volna bizonyítani. Eredményeink szerint a naiv M0 M ϕ -ok önmagukban nem termeltek számottevő mennyiségű IL-10-et és TNF α -t. M1-es és M2b aktiváció során viszont jelentős IL-10- és TNF α -szinteket mérhettünk a felülűsókban. M2b állapotban magasabb IL-10 és alacsonyabb TNF α termelés volt jellemző, ami megfelel a gyulladásgátló, regulátor M ϕ -profilnak. M1-es aktiváltság alatt ez az arány pont fordított, tehát a gyulladáshoz javára eltolt, ami szintén megfeleltethető a gyulladáshoz M1 makrofág profillal. Az M2a M ϕ -ok a naiv M0 sejtekhez hasonlóan nem termeltek jelentős mennyiségű IL-10-et és TNF α -t, azonban – az erre az aktivációs állapotra jellemzően – Ym1-termelésük kiemelkedő volt. Eredményeink szerint tehát sikeresen hoztunk létre M1, M2a és M2b aktivációs profilba tartozó BM-M ϕ -okat. Mivel a különböző indukciók során MSC-k is kerültek a BM-M ϕ -ok mellé, a TNF α szintjének befolyásolásával fejtették ki a hatásukat. M1 és M2b aktivációs környezetben jelentősen csökkentették, míg M2a indukció alatt növelték a citokin felülűsókban mérhető szintjét, miközben az IL-10 vagy a Ym1 mennyiségét nem befolyásolták. Ezzel M1 és főként M2b állapotban a citokinarányt az IL-10 javára tolták el, tehát az MSC-k jelenléte az ilyen induktív környezetekben gyulladásgátló M ϕ -profil kialakulásának kedvez. Kísérleti elrendezésünkben az MSC-k egyik általunk vizsgált faktor termelésére sem voltak képesek.

A csontvelői eredetű makrofágok repolarizációs képessége

Szeretnénk volna kideríteni, hogy a M ϕ -ok egymás után többször is képesek-e különböző polarizációs állapotokba jutni, illetve hogy az MSC-k képesek-e befolyásolni az így létrejövő M ϕ -okat. Ehhez a naiv BM-M ϕ -okat először M1,

majd M2a vagy M2b irányba aktiváltuk, a különböző indukciós lépéseknél pedig MSC-eket adtunk a kultúrákhoz. Az M1-es állapotból M2a-ba vagy M2b-be polarizált M ϕ -ok kultúráinak citokintermelését naiv BM-M ϕ -okból kialakuló M2a és M2b M ϕ -ok citokintermelésével is összehasonlítottuk. A BM-M ϕ -ok M1-es stimuláció hatására jelentős mennyiségű IL-10-et és TNF α -t termeltek. Ezek után az M1-ből M2a irányba repolarizált BM-M ϕ -oknál kialakult az M2a sejtekre jellemző alacsony IL-10 és TNF α termelés, és a magas Ym1 szintézis. Az így létrejövő M2a M ϕ -ok megegyeztek a naiv BM-M ϕ -okból létrehozott M2a M ϕ -okkal – legalábbis az általunk vizsgált három faktor tekintetében. Az M1-ből M2b irányba történő polarizáció során szintén létrejött az M2b M ϕ -okra jellemző citokinprofil: a TNF α /IL-10 arányban a TNF α túlsúlyát az IL-10 dominanciája váltotta fel. Az így kialakuló citokinarány hasonló volt a naiv BM-M ϕ -okból polarizált M2b sejtek citokintermeléséhez, de az IL-10 szintje ez esetben erősebben dominált a felülúszókban. Ym1-termelődés az M1 és M2b állapotokra jellemzően sem az M0 \rightarrow M1 \rightarrow M2b, sem az M0 \rightarrow M2b indukciók során nem volt jelentős. Eredményeink szerint tehát a BM-M ϕ -ok gyulladásoz aktivációt (M1) követően átpolarizálhatóak M2a és M2b irányokba. Érdekes, hogy az MSC-k az előzőleg M1 irányba polarizált M ϕ -okból létrejövő sejteknél már sem M2a, sem M2b irányban nem tudtak hatni a kialakuló citokinprofilokra.

A prosztaglandin-E2 szerepe a csontvelői eredetű makrofágok és MSC-k kölcsönhatásában

Szerettük volna tudni, hogy hogyan képesek befolyásolni az MSC-k a BM-M ϕ -ok citokintermelését. Először a sejt-sejt kontaktus szerepét vizsgáltuk, ehhez a BM-M ϕ -okat és MSC-eket féligáteresztő hártáival választottuk el egymástól az M1, M2a és M2b indukció során. Kiderült, hogy a kokultúrákban mérhető IL-10 és TNF α arányok nem változtak meg a térbeli szeparálás hatására, tehát döntően szolubilis faktorok felelnek az MSC-k hatásáért.

Irodalmi adatok alapján és az általunk Pe-M ϕ -ok vizsgálatánál tapasztalt eredmények szerint az MSC-M ϕ kölcsönhatásban potenciálisan szerepet játszó egyik mediátor a PGE-2 lehet. Ennek vizsgálatára az M2b M ϕ -indukciót választottuk modellrendszerként, mivel az MSC-k ebben az aktivációs állapotban hatottak a legerősebben a BM-M ϕ -ok citokintermelésére. Az M2b indukció során a PGE-2 szintéziséért felelős fő enzimek (COX-1 és COX-2) gátlószereit (Resveratrol és Celecoxib) adtuk a BM-M ϕ -MSC kokultúrákhoz. Eredményeinkből kiderült, hogy a COX-2 enzim gátlásakor a TNF α /IL-10 arányban jelentős TNF α -dominancia alakult ki a gátlószert nem tartalmazó kontroll kokultúrákhoz képest, míg a COX-1

enzim egyedüli gátlásakor ilyen nem figyelhetünk meg. A vizsgálatot M1-es induktív környezetben is megismételtük, ahol hasonló eredményeket kaptunk. A PGE-2 tehát a COX-2 enzimen keresztül termelődve járulhat hozzá ahhoz, hogy MSC-k jelenlétében a BM-M ϕ -ok citokintermelésében az IL-10 dominanciája alakulhat ki. A PGE-2 szerepének további bizonyítására a MSC-k hatását külső forrásból hozzáadott PGE-2 különböző koncentrációival (200 pg/ml; 400 pg/ml; 800 pg/ml) helyettesítettük M2b induktív környezetben. A PGE-2 – már 200 pg/ml-es koncentrációban is – képes volt imitálni az MSC-k hatását, és dóziszfüggően tolt el a TNF α /IL-10 arányát az IL-10 javára a M ϕ -kulturákban. Eredményeink alapján bebizonyosodott, hogy a PGE-2 fontos szerepet játszik az MSC–BM-M ϕ interakcióban.

KÖVETKEZTETÉSEK

1. Sikeresen hoztunk létre C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből olyan sejtenyészeteket, amik fibroblaszt-szerű morfológiájuk, sejtfelszíni markereik, valamint zsír és csont irányú differenciációs képességeik alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők.
2. Igazoltuk az általunk izolált MSC-k immunzsuppresszív aktivitását mitogén és alloantigén-indukált T-sejtes rendszerekben, *in vitro*.
3. Az MSC-k aktivált T-sejtekre gyakorolt szuppresszív hatásában a sejt-sejt kontaktus, valamint a szolubilis mediátorok közül a PGE-2 és az iNOS szerepét mutattuk ki.
4. A TNF α önmagában is, míg az IFN γ csak TNF α jelenlétében képes fokozni az MSC-k PGE-2-termelését. A két gyulladáshoz kötődő citokin hatása szinergisztikus.
5. A TNF α és az IFN γ a COX-2 enzim indukcióján keresztül segíti elő az MSC-k PGE-2-termelését. Az iNOS és a NO – legalábbis részben – az IFN γ útvonalon keresztül, de a TNF α jelpályától függetlenül kapcsolódik a COX-2-indukciós úthoz. Az MSC-k PGE-2-termelésének indukciója tehát redundáns folyamat.
6. Az MSC-k jelenléte fokozza a peritoneális M ϕ -ok fagocitotikus és antigénprezentáló képességét, citokintermelésük pedig TNF α -dominanciáról IL-10-dominanciára vált, tehát a Pe-M ϕ -ok MSC-k jelenlétében gyulladásgátló, M2b-szerű fenotípust mutatnak. A hatás M1 vagy egyéb gyulladáshoz kötődő aktivátorok jelenlétében is megmarad.

7. Sikeresen létre tudtunk hozni egér csontvelői sejtekből differenciáltatott homogén, aktiválatlan, de funkcióképes M ϕ -okat, amiket citokintermelésük alapján sikeresen juttattunk M1, M2a és M2b aktivációs állapotokba.
8. Az MSC-k növelik az M1 és M2b, míg csökkentik az M2a M ϕ -ok fagocitotikus képességét. Citokintermelésükre csak a TNF α -termelés befolyásolásán keresztül hatnak: M1 és M2b M ϕ -ok esetében csökkentik, míg az M2a sejteknél kis mértékben növelik a citokin mennyiségét. Az MSC-k jelenléte M1 és M2b aktivációs környezetben M2b-szerű regulátor M ϕ -fenotípus kialakulását segíti elő.
9. A csontvelői M ϕ -ok képesek M1-es aktivációs állapotból M2a és M2b irányokba újraperarizálódni, az MSC-k azonban nem képesek befolyásolni ezeket az átalakulásokat.
10. Az MSC-k csontvelői M ϕ -okra gyakorolt hatása főként szolubilis mediátorok segítségével jön létre, ezen belül is a COX-2 enzimen keresztül termelődő PGE-2 meghatározó szerepét bizonyítottuk.

SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Kudlik G, Hegyi B, Czibula Á, Monostori É, Buday L, Uher F (2016) Mesenchymal stem cells promote macrophage polarization toward M2b-like cells. *Experimental Cell Research* 348:(1) 36-45.

Kudlik Gy, Matula Zs, Urbán SV, Uher F (2015) A makrofágpolarizáció szerepe a sebgyógyulásban és a szövetregenerációban. *Immunológiai Szemle* 7:(1) 27-37.

Hegyi B, Környei Z, Ferenczi S, Fekete R, Kudlik G, Kovács KJ, Madarász E, Uher F (2014) Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells And Development* 23:(21) 2600-12.

Hegyi B, Kudlik G, Monostori É, Uher F. (2012) Activated T-cells and Pro-Inflammatory Cytokines Differentially Regulate Prostaglandin E2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 215-220.

Hegyi B, Sági B, Kudlik Gy, Uher F. (2012) A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladássos- és immun-folyamatok szabályozásában. *Immunológiai Sz* 4:(2) 4-10

A disszertációtól független publikációk:

Dülk M, Kudlik G, Fekete A, Ernszt D, Kvell K, Pongrácz JE, Meró BL, Szeder B, Radnai L, Geiszt M, Csécsy DE, Kovács T, Uher F, Lányi Á, Vas V, Buday L (2016) The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages. *Scientific Reports* 6: 34280.

Matula Zs, Kudlik Gy, Urbán SV, Uher F (2016) „Quo vadis”, hematológia. *Orvosi Hetilap* 157:(46) 1819-1829.

Kudlik Gy, Matula Zs, Kovács T, Urbán SV, Uher F (2015) A pluri- és multipotencia határán: a ganglionléc őssejtjei. *Orvosi Hetilap* 156:(42) 1683-1694.

Szabó E, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Hornung Á, Makra I, Kudlik G, Uher F, Katona RL, Monostori É, Czibula Á (2015) Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells And Development* 24(18): 2171-2180.

Sági B, Maraghechi P, Urbán SV, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Németh K, Monostori É, Gócsa E, Uher F. (2012) Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs is Determined in the Post-Segmentation Mesoderm. *Stem Cells Dev* 21: 814-828.