

A hematopoetikus őssejtek szerepe az uterus epithelium és az epidermis homeosztázisában és regenerációs folyamataiban

Doktori Tézisek

Dr. Németh Krisztián

Semmelweis Egyetem

Molekuláris Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Kárpáti Sarolta, PhD, DSc

Konzulens: Dr. Mezey Éva, PhD

Opponensek: Dr. Tóth Sára, PhD

Dr. Kóbori László, PhD

Bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Nagy György, PhD, DSc

Tagok: Prof. Dr. Madarász Emília, PhD, DSc

Dr. Szakács Gergely, PhD

Budapest

2011

Bevezetés

Régóta nyilvánvaló a sejtbiológusok számára, hogy a szövetek sejtjeinek élettartama nem azonos a szervezet egészének életidejével. Ahhoz, hogy a szervezet funkcióképes maradjon, a szöveteket felépítő sejteknek folyamatosan újra kell képződniük. A különböző sejtek élettartamától függően a sejtmegújulásra való igény a különböző szövetekben változó. A központi idegrendszer idegsejtjei viszonylag védett környezetben helyezkednek el és az embrionális fejlődés befejezése után (a specifikus neurális kapcsolatok kialakulása után) csak minimális mértékben képesek megújulni. A szájnyálkahártya, vagy a bőr hámsejtjei ezzel ellentétben nap mint nap számtalan fizikai és kémiai behatásnak vannak kitéve (hideg, meleg, mechanikai behatások, pH változás stb.) melyek (mivel sejtpusztulást ill. korai előregedést okoznak) szükségessé teszik a sejtek folyamatos újraképződését. A felnőtt szervezetnek ezt a regenerációs képességét szövetspecifikus őssejtek (másnéven felnőtt őssejtek) biztosítják.

A fejlődésbiológia egyik legfontosabb dogmája - miszerint a felnőtt őssejtek kizárólag saját szövetük sejtjeinek pótlására képesek - az utóbbi évtizedben megdőlni látszik. Ma már számos tudományos közlemény bizonyítja, hogy ez az elképzelés – mint a dogmák többsége – túlzottan merev, ami a természetre soha nem jellemző. Az organizmusok túlélését ősidők óta a természet rugalmassága biztosítja. Magát a folyamatot, amikor egy bizonyos szöveti sejt nem a (kutatók által) rászabott fejlődési irányba indul el, transzifferenciációnak nevezzük. A transzifferenciációt vizsgáló kutatások túlnyomó többsége a csontvelői őssejtek plaszticitását vizsgálja. Az eredmények azt mutatják, hogy mind a hematopoetikus, mind a mesenchymális őssejtek (a csontvelői őssejtek 2 legfontosabb populációja) képesek az eredeti (azaz a leggyakrabban megfigyelt és általunk dogmává merevített) differenciációs programjuktól eltérni és más szövettípusokká alakulni. Régóta tudjuk, hogy a hematopoetikus őssejt fő funkciója a vérképzés, a mesenchymális őssejtek pedig csont, zsír és porc képzésre hivatottak. Sorozatos kutatások meglepő eredménye azonban azt mutatja, hogy ugyanezek a sejtek megfelelő stimulus hatására neuronná, izomszövetté, vagy éppen különböző epitheliális sejtekké is képesek alakulni az organizmus akut szükségletének megfelelően.

Terápiás szempontból a hematopoetikus őssejtek plaszticitása bír kiemelt jelentőséggel, hiszen ezek izolálását, dúsítását és transzplantációját illetően sok évtizedes tapasztalattal rendelkezik már az orvostudomány. Ez azt jelenti, hogy bármilyen új

kísérletes eredménynek komoly klinikai translációs potenciálja lehet, vagyis viszonylag hamar vezethet új terápiás eljáráshoz.

Ezen translációs lehetőségnek köszönhetően kutatásaink fókuszában a hematopoetikus őssejtek illetve ezek transzdifferentiációs képessége áll. Ahhoz, hogy ezeknek a sejteknek a terápiás használhatóságát reálisan megítéljük, először meg kell értenünk úgy fiziológias mind patológias működésüket makroszkópos és molekuláris biológiai szinten, amihez új állatmodellek kifejlesztésére van szükség.

Célkitűzések

Célkitűzéseink meghatározásában az alábbiak játszottak szerepet

1/a. A csontvelői őssejtek uterus hámmá alakulását több kutatócsoport vizsgálta egymásnak látszólagosan ellentmondó eredményekkel. A két legfontosabb publikált tanulmány egyike jelentős (közel 50%-os) csontvelői kimérizmust talált, míg a másik csoport csupán minimális mértékű transzdifferentiációról számolt be.

1/b. A csontvelői transzdifferentiációs kutatások alapmódszere a csontvelőtranszplantáció. Ez a technika lehetővé teszi egy jelölt csontvelő beültetését a recipiens szervezetbe, és ezáltal a donor hematopoetikus sejtek sorsának specifikus követését. Noha kétségtelenül forradalmasította a transzdifferentiációs kutatásokat ez a módszer, számtalan kérdést vet fel ennek a technikának a kizárólagos alkalmazása.

- A legtöbb publikált kísérletben a csontvelő transzplantációt teljes csontvelővel és nem szelektált hematopoetikus őssejtekkel végezték. Ez magával hozza annak a lehetőségét, hogy a transzdifferentiált sejtek egy része (esetleg egésze) non-hematopoetikus (mezenchymális, vagy endotheliális) sejtekből származik, így nehéz kizárólagos következtetést levonni a hematopoetikus őssejtek transzdifferentiációban betöltött szerepéről.
- A csontvelőtranszplantáció első lépése a donor sejtek preparálása. Ez a folyamat a csontvelői sejtek kimosásából, majd sok esetben a vörösvérsejtek líziséből és számos mosási lépépből áll. Ezen hosszas in vitro preparálás során a sejteket stressznek tesszük ki, ami a különböző őssejtpopulációkra eltérő hatással lehet és már ebben a fázisban egyfajta nem szándékos szelekciót is jelenthet.

- A csontvelőtranszplantáció során a recipiens csontvelejét el kell pusztítanunk, hogy megfelelő talajt teremtsünk az implantálandó donor csontvelő számára. Ezt vagy teljes test besugárzással, vagy chemoterápiás készítmények alkalmazásával érhetjük el. Ezek a módszerek - noha magasfokú kimérizmust eredményeznek a recipiens szervezetben - ritkán 100%-os hatásfokúak, így a saját, jelöletlen csontvelő életben maradt sejtjei is résztvehetnek a szövetek regenerációs folyamataiban. Mivel a két résztvevő aránya és megújulási képessége nem kvantifikálható, így a jelölt csontvelő alapján történő számolások félrevezetőek. Továbbá a csontvelő elpusztítására használt fenti módszerek jelentős egyéb szöveti károsodást okozhatnak a recipiens szervezetben ami úgyszintén megnehezíti a transzdifferentiációs folyamatok korrekt megítélését.

2. Az utóbbi néhány évben több kutatócsoport bizonyította, hogy a csontvelői eredetű őssejtek képesek bőr keratinocitává alakulni rágcsálókban is és emberben is. A humán eredmények olyan csontvelőtranszplantált nőbetegek bőr vagy hajmintáiból születtek (átlagosan 3-4 évvel a csontvelő transzplantációt követően), akik férfi donortól kaptak csontvelőt vagy perifériás őssejteket. A vizsgálatok eredményei ellentmondásosak, aminek több, főleg technikai eredetű, magyarázata lehetséges.

- Az egyik kutatócsoport bőrbioptákat gyűjtött férfi csontvelővel transzplantált nőbetegekből, és az ezekből tenyésztett keratinocitákon végzett Y kromoszóma specifikus PCR analízist. Komoly problémát okozhat, hogy az itt alkalmazott módszerben a tenyésztést megelőző hosszas szövet emésztés (az epidermisz és a dermisz elválasztására) megölheti a később vizsgálni kívánt sejtek jelentős hányadát, ezáltal lényegesen csökkentve a transzdifferentiált keratinociták detekciójának esélyét.
- Több más csoport a fejbőrrel gyűjtött hajmintákat elemezve jutott a transzdifferentiációt támogató, vagy cáfoló következtetésre. Az alapvető probléma ezzel a kísérleti megközelítéssel az, hogy nem ismerjük teljes bizonyossággal a kitépett hajszál végén található 'hajhagyma' pontos sejtösszetételét, ráadásul ez az összetétel változhat betegenként,

fejbőrregiónként, és a mintagyűjtési módszerekkel. Negatív transzifferenciációs eredmények jelenthetik csupán azt, hogy kevés folliculus epithel sejt került az elemzett mintába, míg pozitív eredményél nem zárhatjuk ki fehérvérsejtek, vagy papilláris fibroblasztok jelenlétét a specimenben.

Specifikus célok

1/a. A csontvelői őssejtek uterus epitheliummá alakulását vizsgálnánk egy egérmodell segítségével csontvelőtranszplantációt alkalmazva.

1/b. A hematopoietikus őssejtek transzifferenciációs képességének vizsgálatára egy olyan egérmodell kifejlesztése a célunk, amellyel kiküszöbölhetjük a csontvelőtranszplantációt és az ezzel járó technikai és interpretációs nehézségeket.

1/c. A kifejlesztett egérmodellt tesztelni kívánjuk azáltal, hogy megvizsgáljuk a hematopoietikus sejtek uterus epitheliummá alakulásának dinamikáját különböző korú nőstény egerekben, valamint vemhes állatokban.

2. Szövetteni metszeteken, in situ szeretnénk megvizsgálni a hematopoietikus eredetű keratinociták arányát a hátbőrön, valamint a hajas fejbőrön. Célunk megvalósításához olyan nő betegek bőrmintáin végeznénk Y kromoszóma hibridizációt, akik több mint 10 éve estek át férfi donortól származó csontvelőtranszplantáción.

Módszerek

Állatkísérletek

Csontvelő transzplantáció

C57/BL/6J egereket használtunk recipiensnek, míg a donor sejteket Zöld (Green) Fluoreszcens Protein (GFP) transzgén egerekből preparáltuk (C57BL/6-Tg [ACTB-EGFP] 1Osb/J, 003291; Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME, <http://www.jax.org>). A

recipiens egerek először teljes test besugárzáson estek át (900 Rad), majd 2 órával ezt követően 1 millió csontvelő sejtet kaptak intravénásan a farokvénán keresztül.

CD45/Cre transzgén egér létrehozása

Első lépésben inzertáltuk a Cre rekombinááz cDNS-ét egy olyan mesterséges bakteriális kromoszómába (BAC) amely tartalmazza a CD45 gént, aminek kifejeződése a hematopoetikus sejtvonagra jellemző. Az inzerció a CD45 gén után következő belső (internal) riboszómális kapu (entry site) (IRES)-től disztálisan történt. Az így létrehozott BAC-ot használtuk a CD45/Cre egér generálásához. Ezen egerek minden olyan sejtjében kifejeződik a Cre rekombinááz enzim, amely valaha CD45-ot expresszált.

CD45/Cre-Z/EG dupla transzgén egér létrehozása

A CD45-Cre egereket pároztattuk Z/EG egerekkel melyeknek minden sejtjében kifejeződik a lacZ enzim, és tartalmaznak egy inaktív GFP gént is. A keresztezés hatására az utódok minden sejtjében, amiben kifejeződik a Cre enzim, megszűnik a lacZ expresszió és beindul a GFP kifejeződése, így fluoreszcensé téve a sejtet.

Szövetteni festések

A leölt állatokat 4%-os paraformaldehid oldattal transzkardiálisan perfundáltuk, majd a feldolgozni kívánt szöveteket átmenetileg 20%-os szukróz oldatba tettük (krioprotekció). Ezt követően a szövetekből 12 mikrométer vékony friss fagyasztott metszeteket készítettünk Leica cryostatban (Heerbrugg, Switzerland, <http://www.leica.com>). A metszeteket a következő antitestekkel festettük meg: 1:1000-es hígításban nyúl anti-GFP antitest (A11122; Molecular Probes, <http://probes.invitrogen.com>) majd 1:1000-es hígításban Alexa-488 konjugált nyúl ellenes antitest (A31565; Molecular Probes), 1:100-es hígításban anti-CD45 antitest (ab3088-100; Abcam, Cambridge, MA, <http://www.abcam.com>) majd 1:1000-es hígításban Alexa-594-konjugált patkány ellenes antitest (A11007; Molecular Probes), 1:20000-es hígításban 4,6-diamidino- 2-phenylindole (DAPI) (D1306; Molecular Probes), valamint 1:200-es hígításban epithelium specifikus biotinilált *Lotus tetragonolobus* lectin (B-1325; Vector Laboratories, Burlingame, CA, <http://www.vectorlabs.com>) majd 1:1000-es hígításban Alexa-594-konjugált streptavidin (S11227; Molecular Probes) vagy 1:1000-es hígításban torma-peroxidáz-

konjugált streptavidin és 1:1000-es hígításban Alexa-350-konjugált tyramide (T20937; Molecular Probes). Az epithelium egy második markereként széles spektrumú cytokeratin ellenes antitestet (MU-131-UC; BioGenex, San Ramon, CA, <http://www.biogenex.com>) használtunk 1:200 hígításban majd ezt egy Alexa-594-hez konjugált egér ellenes IgG antitesttel hívtuk elő (1:1000-es hígításban). Az immunfestés kontrolljaként egyedül másodlagos antitesteket használtunk primer antitest inkubáció nélkül.

Flow citometria

A levett vérből preparált leukocitákat először CD16/CD32 ellenes antitesttel kezeltük, hogy gátoljuk az Fc receptorok aspecifikus antitest kötését, majd patkány R-phycoerythinhez konjugált egér CD45 (a fehérvérsejt vonalra specifikus sejtfelszíni antigén) ellenes antitesttel festettük meg. Kontrollként patkány R-phycoerythinhez konjugált IgG2b izotípusú antitestet használtunk. A FACS analízist FACS Calibur gépen végeztük (Becton, Dickinson and Company, San Jose, CA, <http://www.bd.com>)

Humán study

Bőrminták gyűjtése

Az incíziós biopsziákat (1 cm x 0.5 cm x 0.5 cm) lokális érzéstelenítésben (Lidocain-Adrenalin USP) gyűjtöttük, majd szövetszövetfagyasztó médiumba helyezve lefagyasztottuk. Összesen 8 betegből gyűjtöttünk mintákat, akiknek mindegyike önkéntesen vett részt a study-ban, egy előzetes etikai engedély alapján (TUKEB, 214/2004). Hat beteg olyan csontvelőtranszplantáción átesett nő volt, akik férfi donor csontvelőt kaptak, kontrollként pedig 1 nőbeteg szolgált, aki nőtől kapott csontvelőt, illetve 1 férfi, aki nem esett át csontvelő transzplantáción. A bőrmintákból 10 mikrométer vékony friss fagyasztott metszeteket készítettünk, majd azokat 4%-os parformaldehid-el 10 perc alatt fixáltuk.

Kombinált dupla immunfestés és in situ hibridizáció

3 féle antitestet használtunk a keratinociták (pán-citokeratin), a fehérvérsejtek (CD45) és az osztódó sejtek (Ki67) azonosítására.

Citokeratin immunfestés

Primer antitestként egér anti-humán citokeratin ellenes antitestet használtunk (Pan-CK antitest ami felismeri a citokeratin 1,5,10 és 14-es típusait - Cat. #VP-C417, Vector Labs, Inc., Burlingame, CA) 1:150 hígításban. Ezt egér ellenes SuperPicture reagens hozzáadása követte (Cat. #87-9163 Invitrogen Corp., Camarillo, CA) majd a pozitív festést tiramid plusz FITC rendszerrel vizualizáltuk (Cat. # NEL741001KT Perkin-Elmer, Inc., Waltham, MA).

Ki67 és CD45 immunfestés

A második immunfestés előtt a hisztológia metszeteket 10 mM citrát pufferben (pH 6.1) mikrohullámú sütőbe helyeztük, majd 50%-os határfokon 5 percig kezeltük. Ez az eljárás blokkolja az első immunfestésből esetlegesen megmaradt peroxidáz molekulákat, ezáltal kiküszöböli az ebből fakadó aspecifikus festést.

Ezt követően a metszeteket egy éjszakára nyúl anti-humán Ki67 antitesttel, vagy anti-humán CD45 antitesttel inkubáltuk 1:200-as hígításban 4 Celsius fokon. Másnap a metszeteket 3x3 percig mostuk 1X PBS-el, majd egy 10 perces kezeléssel blokkoltuk az endogén peroxidázt (Cat.#S2001, Dakocytomation Carpinteria, CA). 30 perces inkubáció következett nyúl ellenes SuperPicture reagenssel (Cat.#87-9263 Invitrogen Corp. Camarillo, CA), majd egy 3X3 perces PBS mosás után a pozitív sejteket tiramid plusz Cy5 rendszerrel (Cat. # NEL745001KT Perkin-Elmer, Inc. Waltham, MA) vizualizáltuk.

Y kromoszóma kimutatása FISH-el

Digoxigeninnel jelölt próbát használtunk az Y kromoszóma non-radioaktív kimutatására. A próbát előmelegített lemezhez adjuk hozzá, hogy a megolvadt DNS-hez hozzá tudjon kötni; utána a metszeteket először 81 Celsius fokon 12 percig, majd 55 Celsius fokon 30 percig inkubáltuk. A lemezeket ezt követően egyre hígabb SSC oldatban mostuk, majd peroxidáz konjugált anti-digoxigenin antitesttel inkubáltuk 1:400-as hígításban. A pozitív Y kromoszóma festést Alexa-594 tiramid (Perkin-Elmers) hozzáadásával vizualizáltuk. Végül a mikroszkópos analízis előtt DAPI festést használtunk a sejtmagok láthatóvá tételére.

Hisztológiai analízis

A mikroszkópos analízishez 3 non-konzekutív (300 mikrométer különbséggel a metszetek között) metszetet használtunk minden biopsziás mintából. Átlagosan mintánként 20 látóteret analizáltunk: leszámoltuk a DAPI pozitív, majd az Y kromoszóma és Y kromoszóma plusz citokeratin pozitív sejteket (NIH ImageJ program - Mac Vs 1.43).

Eredmények

Az uterus epithelium transzdifferentiációjának vizsgálata egérmodellekben

Csontvelőtranszplantáció

Első lépésben egy tradicionális csontvelőtranszplantációs modellt választottunk a uterus epithelium csontvelői eredetének vizsgálatára. Teljestest besugárzás után GFP pozitív csontvelőt ültettünk a recipiens egerekbe, és 8-12 hónap elteltével szövettani analízisnek vetettük alá az uterust. Kombinált GFP, cytokeratin, és CD45 immunfestéseink alapján kijelenthetjük, hogy közel 1 évvel a csontvelőtranszplantáció után az uterushám jelentős része GFP/cytokeratin dupla-pozitív sejtekből áll, vagyis csontvelői őssejtekből pótlódik.

A CD45/Cre-Z/EG transzgén egér elemzése

Várakozásainknak megfelelően a CD45/Cre-Z/EG egerek CD45 pozitív fehérvérsejtjei GFP expressziót mutattak úgy mikroszkópos, mind FACS analízissel.

(Ezenkívül számos olyan szövetben is találtunk zöld fluoreszcens sejteket melyekben várható véreredetű sejtek megjelenése: ilyenek a máj Kupffer sejtei, vagy a központi idegrendszer mikrogliaja).

A csontvelői sejtek transzdifferentiációjának vizsgálatára, egy ciklikusan változó és emiatt nagy regenerációs igényű szövetet, az uterus epitheliumot választottuk új egérmodellünknek a tesztelésére.

Az uterus strómájában számos GFP pozitív sejtet találtunk, melyek egyúttal CD45 pozitívak is voltak. Ezek a sejtek a strómában leírt jelentős számú immunsejtnek felelhetnek meg (főleg limfociták és makrofágok), jelenlétük tehát nem okozott

meglepetést. Az viszont annál érdekesebb volt, hogy az uterus epithelsejtek között is megjelentek GFP pozitív sejtek. Morfológiájuk, L. tetragonolobus lektin affinitásuk, keratin expressziójuk, és a CD45 antigén hiánya arra utalt, hogy ezek lege artis epithelialis sejtek, nem pedig intraepitheliális immunsejtek. Érdekes volt az ilyen sejtek eloszlása: nem random, hanem columnáris elhelyezkedésük volt. Hogy kiderítsük milyen arányban járulnak hozzá csontvelői eredetű sejtek a periódikusan újraképződő uterus hámhhoz, különböző korú egereket hasonlítottunk össze. Az első ösztrusz ciklus az egerek 4-6 hetes korában történik, és ezt követően 5-6 naponta megismétlődik. Ciklusonként a hám elpusztul, az epitheliális sejtek vakuoláris degeneráción esnek át, majd az epithelium újraképződik. Ebből következik, hogy egy 1 hetes egérben még nem volt szükség uterushám regenerációra, míg egy 6 hetes egérben körülbelül 2-szer, egy 12 hetesben 10-szer, és egy 20 hetesben hozzávetőlegesen 26 alkalommal ismétlődött meg a degeneráció/regeneráció ciklus. Hisztológiai elemzésünk során 1 és 6 hetes egerekben nem találtunk GFP pozitív uterushám sejtet, míg idővel egyre több zöld epithel sejt jelent meg. 12 hetes egerekben az összes epithelsejt 0,5%-a, 20 hetes egerekben közel 6%-a GFP pozitivitást mutatott. Terhesség alatt, mivel az uterus ürege sokszorosára növekszik, az uterus epithelium jelentős proliferációs aktivitásra tesz szert, megsokszorozva az eredeti hám felszínét (ez körülbelül 25x-ös felszínnyagobbodás jelent). Hogy kiderítsük milyen mértékben járulnak hozzá véreredetű sejtek a terhes uterushám kifejlődéséhez, vemhes CD45/Cre-Z/EG transzgen egerek uterusát elemeztük szövettanilag. Legnagyobb meglepetésünkre a terhesség második felére a vizsgált állatok uterushámsejtjeinek túlnyomó többsége (több mint 80%-a!) GFP expressziót mutatott. Eredményeinket összefoglalva elmondhatjuk, hogy a hematopoetikus őssejtek képesek méhnyálkahártya hámsejteké differenciálódni, ennek az átalakulásnak a mértéke a lezajlott degenerációs/regenerációs ciklusok számával (és így az életkorral) pozitívan korelál, és terhességben kritikus mértékben felerősödik ennek a folyamatnak a jelentősége.

Donor eredetű keratinociták detekciója csontvelőtranszplantált nőbetegek bőrmintáiban

Hat csontvelőtranszplantált nő bőrében vizsgáltuk az Y kromoszómát tartalmazó keratinociták arányát. Mivel a nőbetegek férfi önkéntesekből izolált hematopoetikus

össejtek kaptak, minden Y kromoszómát tartalmazó keratinocita hematopoetikus eredetűnek tekinthető, vagyis transzdifferentiálódott sejt kell legyen. Minden vizsgált bőrmintában találtunk Y kromoszóma pozitív keratinocitát, igaz különböző mennyiségben. A hátbőrön ezen sejtek aránya 0.32% és 1.08% között változott, míg a hajas fejbőrön a citokeratin pozitív sejtek 0.37%-1.78%-a bizonyult csontvelő eredetűnek. Mindez arra enged következtetni, hogy a folyamatos hajnövekedést biztosító fejbőr epidermisz a hátbőrnél valamivel nagyobb mértékben képes csontvelői őssejtek segítségével megújulni. A következő kérdésünk az volt, hogy a csontvelőből származó keratinociták képesek-e a hámon belül osztódni. Hogy ezt kiderítsük, egy kizárólag osztódó sejtekben található marker, a Ki67, jelenlétét vizsgáltuk az epidermiszben. Eredményeink azt mutatták, hogy alacsony számban, de előfordulnak proliferáló csontvelői őssejt eredetű keratinociták a hámban.

Következtetések

Az a megfigyelésünk, hogy az idő múlásával az uterus epithelium egyre nagyobb hányada pótlódik hematopoetikus eredetű sejtekből (valamint, hogy a terhesség alatt az uterushám több mint 80%-a csontvelői eredetű) arra utal, hogy a csontvelő aktív szerepet játszik a méhnyálkahártya fiziológias utánpótlásában. Mivel a transzdifferentiálódott sejtek többsége a hámon belül szigetszerűen jelenik meg, jól elkülönülő csoportokat alkotva, valószínűsíthető, hogy ezek a csontvelői eredetű epithelsejtek klonális eredetűek, vagyis a folyamat néhány csontvelői sejt transzdifferentiációjával kezdődik, majd ezt követően a már beépült sejtek továbbosztódnak, kisebb intraepitheliális kolóniákat alkotva. Eredményeink, az uterushám fiziológiáján kívül patológias folyamatok, például az endometriózis magyarázatául is szolgálhatnak. Az endometriózis olyan betegség, melyben a (normális esetben csak a méh belső felszínén található) méhnyálkahártya-szövet a méh üregén kívül is (például a vastagbélben, tüdőben, vagy akár az agyban is) megjelenik és az ösztrogén ciklusnak megfelelően vérzéses, illetve egyéb fájdalommal járó tüneteket provokál. A transzdifferentiációs eredményeink alapján könnyen elképzelhető, hogy a csontvelői őssejtek rossz helyen, a méhen kívül kapnak olyan stimulusokat, amelyek beindítják bennük az uterus epitheliummá differentiálódás programját. Ezek az eltévedt

sejtek ezután klonálisan osztódnak, és egy ektópiás méhnyálkahártyát hoznak létre amely a továbbiakban számos tünet forrása lehet.

A humán bőrmintákból generált adataink azt mutatták, hogy a hajas fejbőrben, ahol az állandóan növésben lévő haj folyamatos utánpótlást kíván, szignifikánsan több csontvelői eredetű keratinocita jelent meg. Ez közvetve azt is jelenti, hogy minden olyan szignál (sérülés, fokozott epidermális proliferáció, stb.) amely a hám osztódását felgyorsítja egyben a csontvelői beépülést is stimulálja. Ez a jelenség alapját képezheti a csontvelői őssejtek traumatológiában, vagy bőrgyógyászatban való felhasználásának, nagyobb hámfelszínre pótlására, vagy genetikai bőrbetegségek, például epidermolysis bullosa korrekciójára.

Összefoglalás

Az utóbbi évtized kutatási eredményei azt sugallják, hogy a csontvelői hematopoetikus őssejtek az érett vérsejteken kívül más sejt (illetve szövet) - típusok kialakítására is képesek. Ennek a folyamatnak -röviden transzdifferentiációnak- a mértéke nagyban függ a vizsgált szövet homeosztázisától és aktuális regenerációs igényétől. A transzdifferentiáció pontos megítélését ugyanakkor jelentősen befolyásolják a jelenség tanulmányozásához használt kutatási módszerek is. Az alkalmazott mintagyűjtés, illetve a választott analitikus módszerek nem mindig teszik lehetővé a szöveti kimérezmus mértékének pontos megállapítását. Ezzel magyarázható, hogy a tudományos irodalomban fellelhető kutatások sok esetben egymásnak ellentmondó következtetésre jutottak a transzdifferentiáció fiziológiás jelentőségét illetően. Kutatásunk célja az volt, hogy új állatmodellek fejlesztésével, illetve komplex szövettani analitikai módszereket alkalmazva megvizsgáljuk a csontvelői hematopoetikus őssejtek epitheliális (uterus epithelium illetve bőr epidermis) regenerációban betöltött szerepét.

A Cre/lox génmanipulációs rendszer segítségével létrehoztunk egy olyan egeret, amelynek minden olyan sejtje, amely valaha expresszálta a CD45 fehérjét (vagyis hematopoetikus eredetű) zölden fluoreszkál. Ez azt jelenti, hogy ha egy vérsejt transzdifferentiálódik, vagyis az eredeti differentiációs programjától eltér, a GFP expresszióját ettől függetlenül megtartja, vagyis az újonnan létrejött sejt (pl bőr keratinocita) hematopoetikus eredete bizonyítható. A transzdifferentiációs

kutatásokban standard módszernek tekinthető csontvelőtranszplantációs modellel, valamint az általunk kifejlesztett új egér modell segítségével megvizsgáltuk, hogy a csontvelői hematopoetikus sejtek milyen mértékben képesek hozzájárulni az egér uterus epithelium regenerálódásához. Eredményeink azt mutatták, hogy az idő előrehaladtával - több degenerációs/regenerációs ciklust követően - az uterus epitheliumban egyre több a GFP expressziót mutató hámsejt. Ez a regenerációs igénytől függő transzdifferentiációs potenciál a terhes uterus vizsgálatakor vált legszembetűnőbbé. Meglepetésünkre, a vemhes egér méhnyálkahártya hámsejtjeinek túlnyomó többsége GFP pozitív, vagyis csontvelői eredetűnek bizonyult. Ez arra utal, hogy a csontvelő képes alkalmazkodni az endometrium fokozott regenerációs igényéhez, és aktívan résztvesz a megnagyobbodó uterus hámjának felépítésében. Eredményeink egyben azt is bizonyítják, hogy az általunk kifejlesztett egérmodell alkalmas a csontvelői eredetű transzdifferentiáció tanulmányozására, és a jövőben kiválthatja a csontvelőtranszplantációs modellt, megszabadulva annak minden ismert fent leírt hátrányától.

Humán kísérleteink középpontjában a bőr epidermis állt. Olyan, csontvelő transzplantáción legalább 10 éve átesett nőbetegekből gyűjtöttünk bőrmintákat, akik férfi donortól kaptak csontvelőt. Mivel nőkben normálisan nem találunk Y kromoszómát, a férfi donor hematopoetikus sejtjei viszont XY nemi kromoszómákkal rendelkeznek, minden Y kromoszóma tartalmú sejt, ami megjelenik a csontvelő recipiensben donor csontvelő eredetűnek tekinthető. Ezt a törvényszerűséget kihasználva, a csontvelőből származó keratinociták analizéséhez kombináltuk az Y kromoszóma specifikus in situ hibridizációt és a keratinocita specifikus immunfestést. Összefoglalva elmondhatjuk, hogy több mint 10 évvel a csontvelőtranszplantáció után mind a hátbőrön, mind a hajas fejbőrön fellelhetőek csontvelő eredetű keratinociták, melyek az összes keratinocita körülbelül 1%-át teszik ki. Ki-67 (egy sejtproliferációs antigén) specifikus immunfestésünk, valamint a donor sejtek epidermiszben több helyen megfigyelt oszlopszerű elhelyezkedése arra utal, hogy – hasonlóan az uterus epitheliumhoz - a beépülő csontvelői eredetű keratinociták klonálisak, és képesek osztódni.

Közlemények jegyzéke

A tézishez kapcsolódó közlemények

Nemeth K, Key S, Bottlik G, Masszi T, Mezey E, Karpati S.

Analyses of donor derived keratinocytes in hairy and non-hairy skin biopsies of female patients following allogeneic male bone marrow transplantation.

Stem Cells Dev. 2011 Feb 2. [Epub ahead of print]

IF: 4,14

Bratincsák A, Brownstein MJ, Cassiani-Ingoni R, Pastorino S, Szalayova I, Tóth ZE, Key S, **Németh K**, Pickel J, Mezey E. CD45-positive blood cells give rise to uterine epithelial cells in mice.

Stem Cells. 2007 Nov;25(11):2820-6.

IF: 7,53

A tézishez fel nem használt egyéb közlemények

Brown JM, **Nemeth K** Kushnir-Sukhov NM, Metcalfe DD, Mezey E.

Bone marrow stromal cells inhibit mast cell functions via a COX2 dependent mechanism

Clin Exp Allergy. 2011Jan 24. [Epub ahead of print]

IF: 4,08

Németh K, Keane-Myers A, Brown JM, Metcalfe DD, Gorham, JD,

Bundoc VG, Hodges MG, Jelinek I, Madala S, Karpati S and Mezey E

Bone marrow stromal cells use TGF- β to suppress allergic responses in a mouse model of ragweed-induced asthma

Proc Natl Acad Sci U S A. 2010 Mar 23;107(12):5652-7.

IF: 9,43

Németh K, Mayer B, Mezey E,

Modulation of bone marrow stromal cell functions in infectious diseases by toll-like receptor ligands.

J Mol Med 2010 Jan;88(1):5-10. Epub 2009 Sep 13

IF: 5,00

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.

Nature Medicine. 2009 Jan;15(1):42-9.

IF: 27,55

Mezey E, Mayer B, **Németh K**.

Unexpected roles for bone marrow stromal cells (or MSCs): a real promise for cellular, but not replacement, therapy.

Oral Dis. 2009 Jul 27. [Epub ahead of print]

IF: 1,92

Toth ZE, Leker RR, Shahar T, Pastorino S, Szalayova I, Asemenev B, Key S, Parmelee A, Mayer B, **Nemeth K**, Bratincsák A, Mezey E.

The combination of granulocyte colony-stimulating factor and stem cell factor significantly increases the number of bone marrow-derived endothelial cells in brains of mice following cerebral ischemia.

Blood. 2008 Jun 15;111(12):5544-52.

IF: 10,43

Centlow M, Carninci P, **Nemeth K**, Mezey E, Brownstein M, Hansson SR.

Placental expression profiling in preeclampsia: local overproduction of hemoglobin may drive pathological changes.

Fertility and Sterility. 2008 Nov;90(5):1834-43.

IF: 4,16

Toth ZE, Shahar T, Leker R, Szalayova I, Bratincsák A, Key S, Lonyai A, **Németh K**, Mezey E.

Sensitive detection of GFP utilizing tyramide signal amplification to overcome gene silencing.

Exp Cell Res. 2007 May 15;313(9):1943-50. Epub 2007 Mar 12

IF: 3,69