

MAGYAR TUDOMÁNYOS AKADÉMIA
SZEGEDI BIOLÓGIAI KUTATÓKÖZPONT
GENETIKAI INTÉZET

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

Ph.D. értekezés tézisei

Szabó Enikő

Témavezetők:

*Monostori Éva, Ph.D., D.Sc.
tudományos tanácsadó*

*Czibula Ágnes, Ph.D.,
tudományos munkatárs*

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI ÉS INFORMATIKAI KAR
BIOLÓGIA DOKTORI ISKOLA

2015

Bevezető

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

Célkitűzések

Annak vizsgálatára, hogy hogyan jellemezhető az MSC populáció funkcionális heterogenitása és ezt hogyan befolyásolja a gyulladásos mikrokörnyezet, a következő kérdéseket fogalmaztuk meg:

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

Alkalmazott módszerek

Az MSC sejteket vad típusú C57BL/6 egér csontvelőjéből izoláltuk, majd szövetkultúrában szaporítottuk és tartottuk fenn. Az MSC kultúrát hígítással módszerrel klónoztuk létrehozva a munkánk során tanulmányozott MSC2-MSC6 klónokat. A speciális médiumban az MSC klónok csontképző sejtté és zsírsejtté történő differenciációját hisztokémiai festésekkel (Alizarin Red, illetve Adipored™) vizsgáltuk. Az MSC klónok proangiogén hatását a prevascularis struktúra teszttel ellenőriztük, mely során endotélsejteket és MSC-eket növesztettünk együtt három napig, majd a kialakuló sejtcsoportosulások hosszát CellR Imaging szoftver segítségével mértük le.

Az MSC klónok immunosuppresszív képességét az MSC-T-sejt kokultúrában tanulmányoztuk. A T-sejteket a kokultúrát megelőzően egy növényi lektinnel, a ConA-val aktiváltuk. Az MSC-k T-sejtre kifejtett osztódásgátló hatását a T-sejtek CFSE fluoreszcens jelölését követően áramlási citometriával detektáltuk. Az immunosuppresszióért felelős faktorok, a nitrogén-monoxid (NO), prosztaglandin E2 (PGE2), és indolamin-2,3-dioxigenáz 1 (IDO1) szerepét specifikus gátlószerek (L-NMMA, indometacin, 1-metil-triptofán) hozzáadásával vizsgáltuk. A génexpressziót kvantitatív valós idejű polimeráz láncreakció (qRT-PCR) segítségével analizáltuk.

Az MSC klónok citokinekkal történő előkezeléséhez a sejteket 24 óráig IFN- γ -val és TNF- α -val inkubáltuk.

A késői típusú túlérzékenységi reakciót (DTH), C57BL/6 egerek bőre alá történő primer ovalbumin oltással, majd az egerek talpába injektált ovalbuminnal váltottuk ki. A primer oltással egyidejűleg hasüregbe oltott MSC-eket, vagy PBS-t alkalmaztunk. A DTH reakciót a talppárna vastagságának mérésével ellenőriztük.

Eredmények

- **Az MSC klónok morfológiája, osztódása, sejtfelszíni markerprofilja és differenciálódási képessége.**
 - Az MSC klónok fibroblasztszerű morfológiával és hasonló osztódási rátával rendelkeznek. Mindegyik klón immunfenotípusa hasonló: CD45⁻ CD11b⁻, CD29⁺, CD44⁺, CD73⁺, CD106⁺, CD119⁺ és Sca-1⁺, mely megfelel az MSC kritériumainak.
 - Specifikus faktorok jelenlétében csontképző sejt és zsírsejt irányba differenciálthatóak. A hisztokémiai festések alapján az MSC2, MSC4 és MSC5 klónok erőteljesebben, míg az MSC3 és MSC6 klónok gyengébben differenciálódnak csontképző sejt irányba. A klónok zsírsejt irányú differenciációja az áramlási citometriás lipidkvantitálást alapul véve hasonló mértékű.

- **Az MSC klónok proangiogén hatásúak.**
 - Az MSC klónok *in vitro* prevascularis modell rendszerben hasonló mértékben támogatják a prevascularis struktúrák képződését endotélsejtekkel alkotott kokultúrában, mely a prevascularis struktúrák hosszának mérésével igazolható.
 - Az MSC klónok proangiogén faktor (VEGF, angiopoietin-1) expressziója és termelése (galektin-1) hasonló.
- **Az MSC klónok különböző mértékben gátolják a T-sejtek osztódását. A NO kulcs fontosságú mediátor a folyamatban.**
 - *In vitro* proliferációs tesztben az MSC klónok mindegyike szignifikánsan gátolja a ConA-aktivált T-sejtek osztódását. A gátlás mértéke azonban jelentősen eltér az egyes MSC klónok között: az MSC2, MSC4 és MSC5 erősen, az MSC3 és MSC6 gyengén gátolta a T-sejtek osztódását. Ennek alapján a klónok gátlóképesség szerint a következő sorrendbe állíthatóak: $MSC2 \geq MSC5 > MSC4 > MSC3 \gg MSC6$.
 - A T-sejt proliferáció gátlásában mutatott különbségek az MSC klónok a nitrogén-monoxid szintáz 2 (*Nos2*) génkifejeződésében is tükröződnek, mivel az erősen gátló MSC2, MSC4 és MSC5 klónokban magasan, a gyengén gátló MSC3 klónban alacsonyan, a leggyengébben gátló MSC6 klónban pedig egyáltalán nem fejeződik ki. A NO termelést a NOS2 specifikus inhibitora, az L-NMMA gátolja és ennek következményeként az erősen antiproliferatív aktivitással rendelkező klón, az MSC2 hatását blokkolja.
 - A PGE2 termelés gátlása indometacin inhibítorral az MSC2 klón antiproliferatív aktivitásának részleges felfüggesztését eredményezi.
- **A gyulladásos citokinek csökkentik az MSC klónok differenciálódási képességét és proangiogén funkcióját.**
 - Az MSC2 erős csont irányú differenciálódásra készíthető megfelelő faktorok jelenlétében, A gyulladásos környezetet imitáló IFN- γ -val és TNF- α -val történő előkezelés hatására elveszíti csontképző sejt irányú differenciálódási képességét. Ezzel összhangban az IFN- γ /TNF- α -kezelt klónokban a csont irányú differenciációt jelző gének (*Runx2*, *Bglap*, *Spp1*) kifejeződése csökken a kezeletlen kontrollokhoz képest.
 - A gyulladásos mikrokörnyezet hatására az MSC klónok proangiogén aktivitása megszűnik, amelyet a prevascularis tesztben a struktúrák kialakulásának elmaradása mutat.
- **A gyulladásos citokinek serkentik a T-sejt osztódást gyengén gátló MSC klónok antiproliferatív aktivitását. A NO kulcs faktor ebben a folyamatban.**
 - Az IFN- γ -val és TNF- α -val előkezelt MSC klónok mindegyike erősen gátolja a T-sejtek osztódását. A gátlóképesség fokozódása a gyengén gátló MSC3 és MSC6 klónokban a legkifejezettebb.

- A gyulladásban szerepet játszó faktorok, a *Nos2*, *Ptgs2* és *Idol* gének expressziója jelentősen megnő IFN- γ és TNF- α kezelés hatására.
- Az IFN- γ /TNF- α stimuláció hatására az MSC2 és MSC6 T-sejt proliferáció gátló hatása kiegyenlítődik és a NO termelődésének gátlása (L-NMMA-val) blokkolja mindkét klón antiproliferatív aktivitását. Az indukció hatására termelődő másik két faktor közül a PGE2 termelés gátlása részben blokkolja, míg az IDO1 gátlása nem befolyásolja az MSC klónok T-sejtekre kifejtett hatását.
- **Az MSC klónok hatása az *in vivo* késői típusú hiperszenzitivitási reakcióra.**
 - Az MSC2 és MSC6, melyek a legerősebb, illetve leggyengébb T-sejt antiproliferációs képességekkel rendelkeznek, hasonló aktivitást mutatnak az *in vivo* késői típusú túlérzékenységi reakcióban (DTH) is. Az MSC2 gátolja, míg az MSC6 nem befolyásolja az ovalbuminnal kiváltott DTH választ.
 - A gyulladásos citokinekkal történő előkezelés megszünteti az MSC2 és MSC6 klónok között tapasztalt különbséget, mindkét klón hasonló mértékben csillapítja a gyulladásos reakciót.

Összefoglalás

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

Köszönetnyilvánítás

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

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

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

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

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

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

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

A dolgozat témájához kapcsolódó közlemények:

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

Egyéb közlemények:

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

Idézhető absztraktok:

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

Konferencia előadások:

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

hatásában azonosított új faktor.” Magyar Immunológiai Társaság 40. Vándorgyűlése, Kecskemét, 2011. október 12-14.

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

Konferencia posztterek:

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

NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy a Ph.D. jelölt **Szabó Enikő** jelentős mértékben hozzájárult az alábbi cikk létrehozásához, és téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésben nem használjuk fel.

Szebeni, G. J., Kriston-Pál, É., Blazsó, P., Katona, R. L., Novák, J., Szabó, E., Czibula, Á., Fajka-Boja, R., Hegyi, B., Uher, F., Krenács, L., Joó, G., and Monostori, É. (2012) Identification of Galectin-1 as a Critical Factor in Function of Mouse Mesenchymal Stromal Cell-Mediated Tumor Promotion. *PLoS ONE* 7, e41372

Szeged, 2015. október 7.



Prof. Dr. Monostori Éva
tudományos tanácsadó

MTA Szegedi Biológiai Kutatóközpont
Genetikai Intézet

NYILATKOZAT

Mint az alábbi közlemény felelős szerzője igazolom, hogy **Szabó Enikő** a cikk létrehozásához jelentős mértékben hozzájárult, és kijelentem, hogy a téziseiben felhasznált eredményeket más Ph.D. értekezésében nem használjuk fel.

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

Szeged, 2015. október 7.



Dr. Czibula Ágnes
Tudományos munkatárs
MTA Szegedi Biológiai Központ
Genetikai Intézet