

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

**ÉRFAL EREDETŰ MEZENCHIMÁLIS SZTRÓMA SEJTEK JELLEMZÉSE,
VALAMINT A MEZENCHIMÁLIS SZTRÓMA SEJT-SZERŰ SEJTEK MONOCITA-
DIFFERENCIÁCIÓRA GYAKOROLT HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA**

Türk-Mázló Anett

Témavezető: Prof. Dr. Bácsi Attila



DEBRECENI EGYETEM

MOLEKULÁRIS SEJT- ÉS IMMUNBIOLÓGIAI DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2021

Érfal eredetű mezenchimális sztróma sejtek jellemzése, valamint a mezenchimális sztróma sejt-szerű sejtek monocita-differenciációra gyakorolt hatásának vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében
az elméleti orvostudományok tudományágban

Írta: **Türk-Mázló Anett** okleveles molekuláris biológus

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Sejt- és Immunbiológiai Doktori Iskolája
keretében

Témavezető: **Prof. Dr. Bácsi Attila**

A doktori szigorlati bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

Tagok: Prof. Dr. Szegedi Andrea, MTA doktora
Prof. Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora

A doktori szigorlat helyszíne és időpontja:

DE ÁOK, Immunológiai Intézet, Diskussziós terem, 2021. október 5. 10 óra

Az értekezés bírálói: *Prof. Dr. Antal-Szalmás Péter, MTA doktora*
Prof. Dr. Balogh Péter, MTA doktora

A bírálóbizottság:

Elnök: Prof. Dr. Fésüs László, akadémikus

Tagok: Prof. Dr. Szegedi Andrea, MTA doktora
Prof. Dr. Prohászka Zoltán, MTA doktora

A védés helyszíne és időpontja:

DE ÁOK Augusztá tanterme, 2021. október 5. 14 óra

1. BEVEZETÉS

A homeosztázis alapja a sejtek között zajló dinamikus kommunikáció, mely lehetővé teszi a folyamatosan változó környezethez való alkalmazkodást. Az integritásunk védelmében és a homeosztázis fenntartásában részt vevő sejtek lehetnek immun- és nem immunsejtek egyaránt. A védekezés két fő ága a veleszületett és adaptív immunrendszer, beleértve a felismerésért, az effektor mechanizmusokért és a regenerációért felelős sejteket. A dendritikus sejtek (DS) veleszületett immunsejtek, amelyeket Steinman és Cohn 1973-ban a másodlagos limfoid szövetek kis populációjaként azonosított. Később ezeket a sejteket funkcionálisan a specifikus immunválaszok beindításában és polarizálásában esszenciális sejtként jellemezték. A DS-ek a környezetük dinamikus érzékelésének és más, rezidens szöveti sejtekkel való interakciójának hála meghatározó jelentőséggel bírnak a gyulladásos és anti-inflammatorikus válaszok szabályozása során. Az egyik ilyen legfontosabb szöveti rezidens sejt, a mezenchimális ősvagy sztrómasejt (MSC). A DS-ek és MSC-ek között zajló kommunikáció részleteinek megismerése hozzájárulhat a különböző betegségek mögött álló molekuláris mechanizmusok megértéséhez. Noha számos tanulmány vizsgálta már a két sejttípus egymásra gyakorolt hatását, az eredmények gyakran ellentmondásosak. Ennek hátterében az egyén, a szövetek vagy a sejtek szintjén megnyilvánuló különbségek vagy a sejtek kinyerését követő eltérő tenyésztési körülmények lehetnek.

1.1.Mezenchymális ősv-/sztróma sejtek

Az embrionális, indukált pluripotens és a hematopoietikus sejtek mellett az MSC-ket is intenzíven tanulmányozzák.

Annak ellenére, hogy heterogén populációról van szó, az MSC-k közös tulajdonságaik alapján jellemezhetők: expresszálják a CD73, CD90, CD105, és hiányoznak a vérsejtfejlődési vonalakra jellemző markerek, mint például a CD45, CD34, CD11c, CD14, CD19, vagy a CD79A. Az MSC-k számos szervből és szövetből izolálhatók, mint például a csontvelő, a zsírszövet, a dermis, az ízületi membrán, a köldökzsinór, a méh, a perifériás vér, a parodontális szalag, a fogpép, az izom, a mandulák és az érfal. A különböző szerv / szövet eredetű és lokalizációjú MSC-k morfológiai és biológiai jellemzőikben különböznek egymástól. Ezenkívül számos kísérlet arra utal, hogy a különböző szövetekből származó MSC-ek differenciálódási képességükben és immunmoduláló aktivitásukban is eltérhetnek egymástól. Az érfalak sejtjes komponensei jól ismertek. Sok kérdés merült fel azonban az érfal sejtjeinek pótlásáért felelős ősv / sztróma sejtekkel kapcsolatban. A periciták és az endothelsejtek lehetséges mezenchimális eredete részben megmagyarázza, hogy a perivascularis MSC-k miért

nem különböztethetők meg egyértelműen a többi érfalat alkotó sejttypustól. Az MSC-k – az eredetüktől függetlenül - immunmoduláló aktivitással rendelkeznek. Immunválaszra gyakorolt hatásuk rendkívül összetett és szerteágazó. Az MSC-k közvetlen sejt-sejt interakciók vagy szolubilis mediátorok termelése révén befolyásolhatják az immunsejtek differenciálódását és funkcionális tulajdonságait. Immunszabályozó aktivitásuk nagyban a környezeti tényezők függvénye.

1.2. Az MSC-ek immunológiai szempontból releváns működése

Az MSC-k központi szerepet játszanak az immunválaszok során. Ez felvetheti azt a kérdést, hogy az MSC-k immunsejtek, vagy immunreguláló képességgel bíró szöveti-prekursor sejtek-e. Az MSC-k nem spontán immunszuppresszív sejtek; immunválaszt finomhangoló szabályozó aktivitásuk a környezeti feltételektől függ. Az MSC-k immunmoduláló aktivitásának szabályozására, így a terápiás hatás befolyásolására mára számos stratégia ismert. Az MSC-k stimulálhatók gyulladásos citokinekkal, növekedési faktorokkal vagy akár patogénekkel-asszociált molekuláris mintázatokkal (PAMP). Az immunválasz során a T-sejtek és az antigént bemutató sejtek gyulladásos citokineket termelnek, amelyek (i) immunszuppresszív faktorok felszabadulásához, (ii) a felszíni molekulák megváltozott expressziójához és (iii) növekedési faktorok MSC-k általi termeléséhez vezetnek. Az MSC-k intravénás beadást követően hamar elpusztulnak, így felmerül a kérdés: hogyan fejthetik ki hosszú távon immunmoduláló hatásukat.

1.3. Az MSC-ek immunválaszt szabályozó működése

Az MSC-k alapvető szerepet játszanak az immun homeosztázis fenntartása során azáltal, hogy közvetett vagy közvetlen módon kölcsönhatásba lépnek az immunsejtekkel.

Az MSC-ek felszínükön CD39 és CD73 ektonukleotidázokat fejeznek ki, így képesek az adenosin-trifoszfátot (ATP) adenosinná alakítani, mellyel gátolják az extracelluláris ATP gyulladáskeltő hatását. Képesek nitrogén-monoxidot (NO), indolamin-2,3-dioxigenáz (IDO), a tumor nekrosis faktorral stimulált 6-os gént (TSG-6), az interleukin-10-et (IL-10), TGFβ-át, IL-6, prosztaglandin E2 (PGE2), hepatocita növekedési faktort (HGF), vaszkuláris endoteliális növekedési faktort (VEGF), hem-oxigenáz-1-t (HO-1) és a PD-L1, citotoxikus T-limfocita antigén-4 (CTLA-4) és HLA-G molekulák szekretált formáját termelni. Bár az IL-10 szerepet játszik az MSC által közvetített immunszuppresszióban, azt találták, hogy az MSC-k DS-ek vagy monociták IL-10 termelését indukálják. Beszámoltak arról, hogy az IL-10 termelése összefügg a nem klasszikus HLA I. osztályú HLA-G molekula indukciójával. Ezenkívül az

MSC-k erősen expresszálják a galektin-1-et, amely intracelluláris, sejtfelszínnel asszociált és szekretált formájában is kimutatható. Ezenkívül epidermális növekedési faktor (EGF), fibroblaszt növekedési faktor (FGF), vérlemezkéből származó növekedési faktor (PDGF), vaszkuláris endotheliális növekedési faktor (VEGF), hepatocita növekedési faktor (HGF), inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF- Az 1), az angiopoietin-1 (Ang-1), a sztrómából származó faktor-1 (SDF-1) növekedési faktorok szintén fontos molekulák, amelyek részt vesznek az MSC által vezérelt immunszabályozásban.

Az *in vitro* tenyésztett MSC-k konstitutívan termelnek bizonyos kemokineket, mint a CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 α), CCL4 (MIP-1 β), CCL5 (RANTES), CCL7 (MCP-3), CCL20 (MIP-3 α), CCL26 (eotaxin-3), CXCL1 (GRO α), CXCL2 (GRO β), CXCL5 (ENA-78), CXCL8 (IL-8), CXCL10 (IP-10), CXCL11 (i-TAC), CXCL12 (SDF-1) és CX3CL1 (frankalkin). Ezen kemokinek és az adhéziós molekulák (ICAM- és VCAM-1) szinergetikus hatása révén az immunsejtek az MSC-k közelében feldúsulnak, ahol a szekretált faktorok magas koncentrációja szabályozza a működésüket.

A fent részletezett mechanizmusok alapján az MSC-k immunregulációs szerepe vitathatatlan. Ezen aktivitásuk egyik eszköze a myeloid eredetű sejtek, például monociták, dendritikus sejtek (DS) vagy makrofágok differenciálódásának és funkcionális aktivitásának befolyásolása.

1.4. Monociták

Figyelembe véve a monociták plaszticitásának jelentőségét a gyulladással járó kórképek patogenezisében, a monocita populációk fenotípusos és funkcionális jellemzése kritikus jelentőséggel bír.

Az emberi keringő monocitákat a sejtfelszíni markerek expressziója alapján három különböző alcsoportba lehet besorolni, ami három fő funkcionális alcsoportnak felel meg. A keringő monociták 90–95% -a „klasszikus” CD14^(hi)/CD16^(neg)/CD14⁺⁺ CD16⁻ sejt. A fennmaradó „nem klasszikus” CX3CR1⁺ monociták CD16⁺-ok, és a CD14 expresszió szintje alapján további két alcsoportra oszthatók: A CD14^(med)/CD16^(hi) alcsoport proinflammatorikus vagy gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal is rendelkezhet. A „köztes” CD14^(hi)/CD16^(med/hi) populáció fiziológias körülmények között alacsony számban van jelen a vérben. Ezen heterogén altípusok sajátos funkcionális aktivitását azonban nehéz meghatározni az ellentmondó eredmények és a jelentős átfedések miatt.

Hamers és mtsai. klaszterező analízissel vizsgálták egészséges egyénekből származó monociták heterogenitását. Fenotípusos jellemzőik alapján hét különálló humán monocita alpopulációt azonosítottak. Azt találták, hogy három csoport figyelhető meg a CD16⁺ nem klasszikus

monocita populációban, míg CD14⁺ klasszikus monociták csoportja négy szubpopulációra osztható, ami szemlélteti az emberekben a monociták jelentős heterogenitását.

1.5.Humán monociták eredete és differenciációja

A hemopoetikus őssejtek (HSC) közös limfoid progenitorokká (CLP) vagy myeloid progenitor sejtekké (CMP) differenciálódhatnak. A CMP-k granulocita és makrofág progenitorokká (GMP) differenciálódnak, mely sejtek hagyományosan a monocita-makrofág / dendritikus sejt prekursorok (MDP) és a közös monocita progenitorok (cMoP). Ezek az előalakok együttesen biztosítják a mieloid-eredetű sejtek, mint a granulociták, monociták, makrofágok és DS-ek kialakulását. IL-4 és GM-CSF citokinek jelenlétében a CD14-et expresszáló monociták monocita-eredetű DS-ké (moDS) differenciálódhatnak. A DS-k folyamatosan figyelik mikro környezetüket; összegyűjtik az antigéneket, feldolgozzák és a másodlagos limfoid szövetekbe szállítják, ahol a peptideket specifikus receptorokat kifejező T-limfocitáknak mutatják be.

1.6.Dendritikus sejtek – kostimuláció – T sejt aktiválás

A DS-ek professzionális antigén prezentáló sejtek, így fontos szerepet töltenek be az adaptív immunválaszok koordinálása során. Feladatok a T sejt válasz beindításához szükséges kostimuláció biztosítása is.

A legfontosabb kostimulációs szignált a B7-1 / B7-2 / CD28 molekulák kapcsolódása biztosítja. Carensa és mtsai leírták, hogy a különböző DS alpopulációk igen változatos ko-stimulációs és ko-inhibitorikus profillal jellemezhetők. Az egyik legnagyobb jelentőséggel bíró negatív kostimulációs molekula a CTLA-4, mely az immunválasz előrehaladtával fokozottabban expresszálódik az effektor T-sejteken, illetve konstitutívan kifejeződik a regulátor T-sejtek felszínén. A molekula interakciós partneri szintén a B7 molekulacsalád tagjai, így a CTLA-4 a CD28 aktiváló konstimulációs molekula kompetitora. Egyre több tanulmány lát napvilágot, ahol bizonyos betegségek, például karcinómában szenvedő betegek esetén leírják a CTLA-4 molekula expresszióját mieloid eredetű sejteken. A CTLA-4 ezekben az esetekben is megakadályozhatja a CD28 molekula kötődését a CD80 és CD86 ligandumokhoz, ami gátolja az effektor T-sejt választ. Ezekután nyilvánvaló, hogy bizonyos kórképekben, terápiák vagy akár a homeosztázis fenntartása során is érdemes figyelmet fordítanunk a mieloid sejteken kifejeződő vagy az általuk termelt CTLA-4 molekula jelentőségére. A CTLA-4 szabályozó szerepe az autoimmun betegségekben és a daganatellenes terápiák során mind az egerekben, mind az emberekben még mindig ellentmondásos. Ennek háttérében részben az állhat, hogy

még nem ismerjük a molekula különböző sejteken való kifejeződésének mintázatát és a kifejeződéséhez hozzájáruló, illetve az azt szabályozó mechanizmusokat.

1.7.RAR α magreceptor szerepe a dendritikus sejtek monocitákból történő differenciációjának szabályozásában

A monociták igen plasztikus sejtek, így a környezeti tényezők függvényében tolerogénebb vagy gyulladásos folyamatokat támogató sejtekké is differenciálódhatnak. A differenciációs folyamatok során transzkripciós faktorok, ligand-függő magreceptorok aktiválódnak, melyek meghatározzák, hogy az adott szöveti környezetben mely gének íródnak át. A differenciációt meghatározó mediátorok lehetnek növekedési faktorok, citokinek, mikrobák, metabolitok illetve az étrend egyes összetevői. Ezek egyike az A-vitamin vagy retinol, melyhez akkor juthatunk, ha a molekula prekursorait (β -karotint és retinil-észterek) tartalmazó ételeket fogyasztunk. A retinol két nagyon fontos aktív metabolit előalakja, melyek a retinal és a retinsav (ATRA).

A retinil-észterek a hepatocitákban retinol formájában, kilomikronokban tárolódnak. A molekula a felszabadulását követően komplexet formál a retinal-kötő proteinnel (RBP). Ezek a komplexek a keringés útján eljutnak a sejtekhez, melyek azok jelenlétét a STRA6 retinsav receptor érzékeli. A felismerést követően az A vitamin származék a citoszolba kerül, ahol oxidációs lépések során retinsavvá alakul. A folyamatot az alkohol dehidrogenáz (ADH) és a retinal dehidrogenáz (RALDH) enzimek katalizálják. A retinsav aztán RAR és RXR magreceptorokhoz kötődik szabályozva ezzel számos potenciális target gén transzkripcióját.

A ligand-függő magreceptorok meghatározzák a monociták DS-ké történő differenciációját. Ezek a receptorok 4 fő csoportba sorolhatók: 1. homodimer hormon receptorok RXR, 2. heterodimerek (PPARs, RXRs, RARs, LXRs, VDRs), 3. RXR/RXR, ill. további árva receptor homodimerek és a 4. monomer árva receptorok. Ezen receptorok inaktív formáit a citoplazmában hő sokk proteinekkel komplexben vagy a sejtmagban koreceptor komplexek által represszált formában találhatjuk meg. Ligandumaik jelenlétében a receptorok felszabadulnak a gátlás alól és adott gének, géncsoportok transzkripcióját szabályozzák.

Számos tanulmány vizsgálja az ATRA RAR α receptor ligandum moDS differenciációra gyakorolt hatását. Ismert, hogy a molekula és GM-CSF jelenlétében sajátos fenotípussal és funkciókkal jellemezhető ún. ATRA-moDS-ek fejlődnek. Ezeket a DS-eket proinflammatorikus citokinekkel aktiválva a kontroll (nem ATRA jelenlétében differenciáltatott) sejtekhez képest fokozott MHC-II és CD86 expresszió detektálható. A CD40 jelátvitelt szabályozva fokozza az antigén prezentációt követő T- és B- sejt aktiváció hatékonyságát. Az ATRA-moDS-ek

fokozott allogén T-sejt-proliferációt indukálnak. Ismert továbbá, hogy az moDS-ek felszínén expresszáldó CD1a molekula kifejeződése RAR α -függő és a CD1d molekulával ellentétesen szabályozódik. Ezen molekulák expressziójának szabályozása révén az ATRA nem csak a konvencionális T sejt választ, de a CD1-korlátozott NKT sejtek aktivációját is befolyásolja.

1.8.MSC-ek hatása a monocita eredetű dendritikus sejtek differenciációjára

Az MSC-ek mind az adaptív, mind pedig a veleszületett immunsejtek fejlődését és funkcionális aktivitását szabályozzák. A monociták fiziológiás és patológias körülmények között egyaránt a keringésből a szövetekbe vándorolnak, ahol szöveti sejtekké, makrofágokká, DS-ké differenciálódnak. A primer MSC-ek hatását erre a differenciációs folyamatra számos tanulmány vizsgálta már, azonban valószínűleg az eltérő forrás és a különböző tenyésztési körülmények miatt a tanulmányok gyakran ellentétes következtetéseket vonnak le.

Az MSC-k képesek modulálni a T és B limfociták, valamint a veleszületett immunsejtek, például granulociták, természetes ölósejtek (NK), monociták, DS-k és makrofágok differenciálódását és funkciót. A CD1a, CD14, CD40, CD80, CD86, CD83 és MHCII szabályozását az MSC-k nagy bizonyossággal modulálják, de a sztrómasejtek közvetett és közvetett hatása többek között ezekre a molekulákra még nem teljesen tisztázott.

2. CÉLKITŰZÉSEK

2.1.I.

Az MSC-k legnagyobb és legismertebb forrása a csontvelő, de egyéb szervekből, szövetekből is izolálhatók, így például erek falából is kinyerhetjük őket. Problémát jelent azonban az MSC-ek egyéb érfaí sejtes komponensektől való megkülönböztetése és izolálása. Ezért igyekeztünk kollagenázos emésztésen alapuló izolációs technikával kinyert, saphena véna falból származó MSC-eket (SV-MSC) karakterizálni, vizsgálni a kinyerés és az izolálás hatékonyságát és összehasonlítani őket a széleskörűen használt és jól karakterizált csontvelői MSC-vel (BM-MSC). Összehasonlítottuk a kétféle MSC:

- mezenchimális irányú elkötelezettségét, multipotens differenciálódási potenciálját,
- hierarchikus klaszterezéssel a sejtfelszíni antigének expressziós mintázatát,
- génexpressziós profilját (Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array)
- mitogénekkal aktivált PBMC proliferációjára gyakorolt hatását,
- különböző stimulációkat („priming”) követően a citokin termelő profiljukat ELISA módszerrel.

2.2.II.

A különböző forrásokból és tenyésztési körülményekből fakadó különbségek miatt hasznosnak bizonyulhat, ha a kísérleteink során standardizálható rendszerben, MSC-sejtvonalak használatával vizsgáljuk az MSC-ek immunoduláló aktivitását. A továbbiakban az ún. MSC1 sejtek monociták differenciációjára gyakorolt közvetett és közvetlen hatásait vizsgáltuk meg. Megfigyeltük az MSC1 sejtek közvetlen és közvetett (MSC1-CM – kondicionált médium) hatását az IL-4 és GM-CSF jelenlétében differenciáltatott moDS-ek:

- protein termelő profiljára protein array és ELISA segítségével
- sejtfelszíni antigén expressziós profiljára, mely során a differenciációs folyamatot és a sejtek funkcionális aktivitását meghatározó kostimulációban és antigén prezentációban szerepet játszó molekulák kifejeződését vizsgáltuk áramlási citometriával,
- allogén naív T-sejt választ aktiváló és polarizáló aktivitására ELISPOT módszerrel és áramlási citometriával

Célunk volt továbbá azonosítani az MSC1 sejtek felülúszójában olyan komponenseket, melyek szerepet játszhatnak az MSC1-CM jelenlétében differenciáltatott moDS-ek fenotípusának funkcionális sajátosságainak kialakítása során. Vizsgáltuk a RAR α magreceptor szerepét az MSC1 sejtek által szabályozott moDS differenciáció során.

3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK

3.1. Etikai nyilatkozat

A humán vérkészítményeket az Országos Vérellátó Szolgálat (OVSZ) debreceni Regionális Vérellátó Központjából igényeltük. A vérminták begyűjtése és tárolása, az Országos Világszövetség által kiadott Helsinki Nyilatkozat etikai irányelveit követve, a donorok előzetes írásos beleegyezésével történt. A humán vérmintákkal történő munkát az OVSZ igazgatója és a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Kutatásetikai Bizottsága engedélyezte. A csontvelő-, köldökszínór- és saphena vénaminták gyűjtését jóváhagyta a Debreceni Egyetem Orvos- és Egészségtudományi Központjának intézményi etikai felülvizsgálati testülete (Orvosi Kutatási Tanács) (Etikai protokollszámok: UD MHSC REC / IEC No. 2754-2008, OSTRAT / 1210-1 / 2008 / OSTR). A szövetmintákat az EU tagállamainak a szövetek izolálásáról szóló 2004/23 / EK irányelvének megfelelően nyertük ki és használtuk fel.

3.2. Monocita szeparálás humán vérből

A perifériás vér mononukleáris sejteket (PBMC) gradiens alapú centrifugálással nyertük ki Ficoll-Paque Plus (*Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország*) segítségével. A CD14⁺ monocitákat a PBMC-ből anti-CD14, paramágneses gyögggyel konjugált ellenanyagokkal nyertük ki pozitív szeparálással, VarioMACS mágneses állványon. Áramlási citometriás mérések alapján az izolált sejtek 96-99%-a CD14⁺ monocita. A monocitákat 4 napig tenyésztettük 12-lyukú tenyésztő lemezen, 1.5×10^6 sejt/ml sűrűségben, 10% FCS-t tartalmazó RPMI-1640 médiumban (*Sigma-Aldrich, Schnelldorf, Germany*), amelyet 80 ng/ml GM-CSF (*Gentaur Molecular Products, Brüsszel, Belgium*) és 100 ng/ml IL-4 (*PeptoTech EC, London, UK*) citokinek valamint MSC1 sejtek vagy az azokról származó 48 órás kondicionált médium (MSC1-CM) jelenlétében differenciáltattuk moDS-ké. Egyes moDS tenyészeteket 1 nM ATRA jelenlétében differenciáltattuk, amelyet a meghatározott kísérleteknél 75 perces inkubáció előzött meg 1 μ M BMS614 specifikus RAR α -antagonistával. A sejteket 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett tenyésztettük.

3.3. Csonvelői, saphena véna és köldökszínórminta

A BM-MSC-k izolálásához a donoroktól 10 ml csontvelő-aspirátumot gyűjtöttünk, amelyeket sóoldattal hígítottunk 1: 3 arányban. A sejteket Ficoll Histopaque (*Amersham Biosciences, Uppsala, Svédország*) sűrűség-gradiens centrifugálással választottuk el. Az életképességet Tripán-kék kizárásos vizsgálattal mértük. A csontvelőből származó magvas sejteket (BMNC) T25-ös tenyésztőflaskában tartottuk fenn 2×10^5 sejt/cm² sűrűségben, és DMEM-LG

médiumban (DMEM 1 g / 1 glükózzal) (*Gibco / Invitrogen, London, Egyesült Királyság*) tenyésztettük, kiegészítve 10% FCS-sel és 1% antimikotikus / antibiotikus oldattal (*PAA Laboratories GmbH, Pasching, Ausztria*). 3-4 nap múlva a nem adherens sejteket lemostuk és friss médiumot adtunk a letapadó sejtekhez. A tápfolyadékot 3-4 naponta cseréltük.

A saphena ereket hideg PBS-ben szállítottuk, és a gyűjtést követő 4 órán belül feldolgoztuk. A mintát megtisztítottuk a zsír- vagy kötőszövetektől, majd apró darabokra vágtuk. Ezeket a szegmenseket PBS-ben mostuk, majd enzimatikusan emésztettük 0.2 mg/ml XI-es kollagenázzal (*Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország*), DMEM-LG tápközegben 60 percig 37 °C-on. A sejteket 20 percig 1000 fordulat/perc sebességgel centrifugáltuk, és két mosási lépés után sejteket a BM-MSC-nél ismertetett módon tenyésztettük. A HUVEC endothél sejteket a köldökzsinórból 12 percig tartó 0.2 mg/ml XI-es kollagenázos enzimátikus emésztéssel izoláltuk. Ezt követően a sejteket 20% FCS-t (*Gibco, London, Egyesült Királyság*), 1% antimikotikus / antibiotikus oldatot (*PAA*) és 1% L-glutamint (*Gibco, London, Egyesült Királyság*) tartalmazó M199 médiumban (*Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország*) tenyésztettük. A sejteket 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett tenyésztettük.

3.4.Mezenchimális sztróma szerű sejtek izolálása és tenyésztése

Vizsgálatainkhoz mezenchymális eredetű sztróma-szerű (MSCI) sejtvonalat használtunk, melyet Prof Dr. Sarkadi Balázs munkacsoportja bocsátott rendelkezésünkre. Az sejtvonala előállításának alapjául szolgáló humán embrionális őssejt vonalakat (HUES9 és HUES1) Dr. Douglas Melton, a Harvard Egyetem munkatársa, a 6681/2012 / EHR számú etikai engedély alapján bocsátotta Prof. Dr. Sarkadi Balázs munkacsoportjának rendelkezésére. A sejtvonala egér embrionális fibroblaszt sejteken (*MEF – mouse embryonic fibroblast*) tenyésztették, melynek eredményeképp spontán differenciáció során embriótestecskék alakultak ki. A tenyészetet alkotó sejteket tripszin használatával elválasztották a kitapadási felülettől a 80. napon, majd tovább tenyésztették zselatinált műanyag flaskában (*TPP, Trasadingen, Switzerland*), 10% FCS tartalmú DMEM médiumban. A sejteket folyékony nitrogénben tárolva, fagyasztott állapotban kaptuk, a 9. passzázt követően. Az MSCI sejteket 10% FCS-t (*Gibco, Paisley, Scotland*), 1% Penicillin-Streptomycin-t (*Hyclone, South Logan, Utah*) és 1 g/liter L-glutamint tartalmazó DMEM (*Gibco, Waltham, Massachusetts, U.S.*) tápoldatban, 5% CO₂-t tartalmazó párasított légterű termosztátban, 37°C-on tenyésztettük. A sejtvonala T75 flaskában (*TPP, Trasadingen, Switzerland*) tartottuk fenn. A sejtenyészetet fénymikroszkóppal kétnaponta ellenőriztük. Amennyiben a tenyészet konfluenssé vált, a sejtek érintkeztek egymással vagy nagyobb csoportokba rendeződtek, az optimális növekedés fenntartása

érdekében passzálást végeztünk 0.02-0.05% Tripszin-EDTA (*Hyclone, South Logan, Utah*) használatával. Az MSC1 sejteket maximum 15 passzálás számig használtuk fel kísérleteink során.

3.5. Multipotens differenciációs potenciál vizsgálata

Az izolált sejtek mezoderma irányú differenciációs potenciálját a kereskedelembe kapható Gibco StemPro® Adipogenesis, Osteogenesis és Chondrogenesis differenciáló médiumok (*Gibco*) segítségével vizsgáltuk. A sejtek zsírsejt irányú differenciációját Oil-Red festést követően, a csont-irányú differenciációt a kalcium lerakódásokat megfestő Alizarin-vörös festést követően figyeltük meg, míg a kondrogenezis kimutatására toluidinkék festést alkalmaztunk. A sejteket ezt követően OLYMPUS IX-81 mikroszkóppal vizsgáltuk.

3.6. Az MSC in vitro aktiválása

A TLR ligandumok és gyulladásos citokinek MSC-ek citokin/kemokin termelésére gyakorolt hatásának vizsgálatához a sejteket 5×10^4 sejtsűrűségben 24 lyukú plate-re raktuk ki, majd az MSC-eket 100 ng/ml LPS-sel (*Sigma-Aldrich, Budapest, Magyarország*), 25 µg/ml PolyI:C-vel (*InvivoGen, San Diego, Kalifornia*), 100 ng/ml TNFα-val, 10 ng/ml IL-1β-val vagy 10 ng/ml IFNγ-val (*Preprotech, Rocky Hill, NJ, USA*) stimuláltuk. 12 vagy 24 óra elteltével a felülúszó citokin/kemokin koncentrációit ELISA módszerrel vizsgáltuk.

3.7. moDS – MSC1 kokultúra készítése

Az MSC1-sejteket 0,02–0,05% tripszin / EDTA oldat felhasználásával Dulbecco PBS-ben (DPBS) gyűjtöttük össze, mostuk, majd $3,6 \times 10^6$ számú sejtet T75-ös flakába készítettünk elő, 12 ml 10% FCS-sel (*Gibco*) és 1% antimikotikus / antibiotikus oldattal (*Hyclone*) kiegészített RPMI-ben (*Sigma-Aldrich*). $1,8 \times 10^7$ frissen izolált monocitát adtunk az MSC1 sejtekhez, azok kitapadását követően, majd a monocitákat négy napig differenciáltuk moDS-ké 80 ng / ml GM-CSF (*Gentaur Molecular Products*) és 100 ng / ml IL-4 (*PeptoTech*) jelenlétében. A differenciálódási folyamat után a moDS-eket pozitív szelekcióval választottuk el az MSC1 sejtektől mágneses sejtszeparáció és anti-CD209 / DC-SIGN-konjugált mikrogyöngyök alkalmazásával, a gyártó utasításait követve (*Miltenyi Biotec*).

3.8. A sejtfelszíni molekulák kifejeződésének vizsgálata áramlási citofluorimetriával

A kontroll, az MSC1-CM, illetve MSC1 sejtek jelenlétében differenciáltatott moDS-ek, illetve a csontvelőből, valamint érfalból izolált MSC-ek és HUVEC sejtek fenotípusát áramlási

citometriával vizsgáltuk. A sejteket FACS pufferben (0.5% BSA, 0.5% nátrium-azid PBS-ban) mostuk. A sejteket 40 µl FACS pufferben vettük fel, majd hozzáadtuk a fluoreszcens festékekkel konjugált anti-humán ellenanyagokat: CD14-fluoreszcein-izotiocianát (FITC), CD209 / DC-SIGN- fikoeritrin (PE), CD1a-FITC, CD80 -FITC, CD86-PE, PD-L1-PE (*BioLegend, San Diego, Kalifornia, USA*), CTLA-4-PE, CD1b-FITC, CD1c-allofikocianin (APC) (*Sony Biotechnology Inc., San Jose, USA*), HLA-DR-FITC (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA), CD34 - FITC, CD44 - FITC, CD45 - APC, CD49f - FITC, CD73 - PE, CD106 - FITC, CD144, CD147 - FITC (*BD Biosciences, San Jose, Kalifornia, USA*), CD49a - PE (*Biolegend, San Diego, Kalifornia, USA*), CD14 - PE, CD29 - PE, CD31 - PE, CD36 - APC, CD47 - APC, CD49b - APC, CD54 - FITC, CD56 - APC, CD69 - APC, CD90 - FITC, CD104 -PE, CD105 - FITC, CD117 - PE, CD146 - APC, CD166 - PE, CXCR4 - APC, HLA-DR - FITC, PDGFRb - PE, VEGFR2 - FITC (*R&D Systems, Minneapolis, MN, USA*) és CD133 - APC (*Miltenyi Biotech, Gladbach, Németország*). A mintákat 30 percig sötétben, jégen inkubáltuk. Az inkubálás után a sejteket a nem kötődött antitestek eltávolítása érdekében FACS pufferrel mostuk, majd 50µl 4% paraformaldehid oldatban (PFA) fixáltuk. Az adott markerek sejfelszíni expressziójával arányos fluoreszcens jelet áramlási citofluoriméterrel, FACSCalibur áramlási citométerrel (*BD Biosciences Immunocytometry Systems, Franklin Lakes, NJ*) detektáltuk (FITC: green emission detector, szűrő: 530/30, PE: Red orange emission detector, szűrő: 585/42) a mért értékeket FlowJo szoftverrel (*Tree Star, OR, USA*) elemeztük.

3.9. Mitogének által indukált sejtprolifерáció vizsgálat

A perifériás vérből származó mononukleáris sejteket (PBMC) Ficoll gradiens centrifugálással (*Amersham Biosciences*) választottuk el. A T-sejt proliferációt 10 µg/ml concanavalin A (ConA) vagy 1 µg/ml fitohemagglutinin (PHA) (*Sigma-Aldrich*) végkoncentrációban alkalmazott mitogénnel váltottuk ki. 10⁴ és 10⁵ SV-MSC-hez 1x10⁶ PBMC-t adtunk, majd a sejteket 3 napig együtt tenyésztettük. A sejtprolifерációt Bromodeoxyuridine (BrdU) kolorimetriás vizsgálattal figyeltük meg a tenyésztőlemezen a gyártó utasításai szerint (*Roche, Budapest, Magyarország*).

3.10. A citokin koncentrációk mérése

A szekretált IL-1β, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, IFNγ, TNFα, TGFβ és IP10 / CXCL10 citokinek/kemokinek koncentrációját OptEIA készletekkel (*BD Biosciences San Jose, CA*) mértük a gyártó utasításait követve. A minták fehérje tartalmával arányos színintenzitásokat spektrofotométerrel, 450 nm hullámhosszon detektáltuk microplate reader (*Biotek, Winooski,*

VT, USA) segítségével. A kapott abszorbancia értékek és a standard sor koncentrációinak ismeretében kiszámítottuk az ismeretlen minták fehérje tartalmát, figyelembe véve a minta hígításokat. A kontroll, MSC1 sejtek közvetlen, vagy közvetett jelenlétében differenciáltatott moDS-ek protein termelő profilját a differenciációs folyamat 4. napján Human XL Cytokine Array Kit segítségével vizsgáltuk a gyártó által megadott utasításokat követve.

3.11. MSC1 sejtek hatása az moDS-k T-limfocita polarizáció képességére

A kontroll, illetve CM-moDS-eket megszámloltuk, mostuk és allogén, naiv T-sejtekkel tenyésztettük együtt három, öt vagy kilenc napig RPMI-1640 médiumban (*Sigma-Aldrich*) 1: 10 moDS: T-sejt arányban. A sejteket 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett tenyésztettük. Másik kondícióban a kontroll és a CM-moDS-eket 2.5 µg/ml anti-CTLA-4 neutralizáló antitestekkel (*LifeSpan BioSciences, San Jose, CA, USA*) inkubáltuk jégen 1,5 órán át, majd a sejteket mostuk és majd T-sejtekkel tenyésztettük együtt három, öt vagy kilenc napig RPMI-1640 médiumban (*Sigma-Aldrich*) 1: 10 moDS: T-sejt arányban. A sejteket 37°C-on 5%-os CO₂ tartalom mellett tenyésztettük. Ezt követően a sejteket speciális ELISPOT platekre vittük át, melyek képesek a T-limfociták által termelt citokinek megkötésére. Avidin-torma peroxidáz alapú enzimhez kapcsolt ImmunoSpot (ELISPOT) rendszerrel (*NatuTec GmbH, Frankfurt am Main, Németország*) vizsgáltuk a T-sejtek IFN γ , IL-4, IL-17 és IL-10 termelését. A citokinek kimutatására szolgáló lemezeket 0.5 µg/ml egér anti-hCD3 antitesttel (*BD Biosciences*) vontuk be. A plate-eket ImmunoScan (*Cell Technology Limited, Shaker Heights, OH, USA*) spot-leolvasóval elemeztük. Annak megállapítására, hogy mely T-limfocita populációk felelősek a citokin termelésért, három, öt vagy kilenc nap elteltével a T-sejteket 1 µg/ml ionomicinnel és 20 ng/ml forbol-mirisztát-acetáttal (PMA) stimuláltuk 4 órán át, és a vezikuláris a transzportot a BD GolgiStop™ fehérje transzport inhibitor (*BD Biosciences*) segítségével blokkoltuk négy órával a sejtfestés előtt. A sejteket anti-humán CD4-Peridinin Chlorophyll Protein Complex (PerCP) konjugált antitestekkel (*BioLegend*) jelöltük. Ezt követően a sejteket fixáltuk és a sejtmembránt permeabilizáltuk BD Cytotfix / Cytoperm™ Plus Fixation / Permeabilization Kit (*BD Biosciences*) segítségével, és anti-humán IFN γ -APC-vel (*BD Biosciences*), anti-humán IL-4-PE-gyel (*R&D Systems*), anti-humán IL-10-Alexa Fluor 488 és anti-humán IL-17-PE (*BioLegend*) antitestekkel jelöltük a sejteket. A fluoreszcencia intenzitásokat a FACS Calibur (*BD Biosciences*) segítségével mértük, az adatokat pedig a FlowJo szoftverrel (*Tree Star, Ashland, OR, USA*) elemeztük.

3.12. Naiv CD4 + T-sejt izolálás

A naiv segítő T-sejteket a vér egyéb sejt komponenseitől CD4⁺ T-sejt szeparáló kit segítségével szeparáltuk negatív szelekciós lépések során a gyártó utasítása szerint (*Miltenyi Biotec*).

3.13. RNS izolálás, cDNS szintézis, valós idejű kvantitatív PCR (RT-qPCR) és mikroarray elemzés

A sejtekből Trizol reagens (*Molecular Research Centr, Inc., Cincinnati, OH, USA*) segítségével RNS-t izoláltunk, melyet high capacity RT kit (*Applied Biosystems, Foster City, CA, USA*) segítségével cDNS-sé írtuk át. Az adott gének expresszióját TaqMan-assay-ek (*Applied Biosystems*) használatával qPCR segítségével vizsgáltuk, DreamTaq DNS-polimeráz enzim és ABI StepOnePlus eszköz segítségével. A h36B4 háztartási gén amplifikációját használtuk normalizáló kontrollként (*Integrated DNA Technologies, Coralville, IA, USA*). A ciklus küszöbértékeit a StepOne Software 2.1-es verziójával (*Applied Biosystems*) határoztuk meg. Az egyes izolált sejtek génexpressziós profiljának összehasonlításához Affymetrix Gene Chip humán gén 1.0 ST -t (*Affymetrix, Santa Clara, Kalifornia, USA*) használtunk.

3.14. Statisztikai analízis

Az adatsorokat parametrikus és nem-parametrikus statisztikai próbákkal elemeztük aszerint, hogy az adatsorok Gauss-eloszlást mutattak-e. Két adatsor összehasonlításakor Student-féle t, vagy Mann-Whitney tesztet végeztünk. Kettőnél több adatsor összehasonlítása során egyutas és kétutas varianciaanalízist alkalmaztunk. Parametrikus varianciaanalízis esetén Bonferroni-féle post-hoc tesztet használtunk. A diagramok a mért paraméterek statisztikai átlagát mutatják $\pm$ SD vagy $\pm$ SEM. Az átlagok és szórások legalább 3 különböző kísérlet eredményéből lettek kiszámolva. Az eredmények közötti különbségeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük, ha 95%-os konfidencia intervallum esetén $p \leq 0,05$. A statisztikailag szignifikáns különbségeket * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$ szerint jelöltük.

4. EREDMÉNYEK

4.1. I. rész

4.1.1. A saphena erekből származó MSC morfológiájának, differenciálódási potenciáljának és fenotípusának vizsgálata

A saphena vénából származó MSC-k (SV-MSK) hasonló morfológiát mutattak, mint a csontvelőből izolált MSC-k (BM-MSK-k). A sejtek nem képeztek „cobblestone” mintázatot, és sokkal nagyobbak voltak, mint az endothel sejtek (HUVEC). HUVEC sejteket használtunk vénaérfalból származó kontroll endothel sejtneként. A két össejttípus mezoderma irányú differenciációs potenciáljának vizsgálata során bizonyítottuk, hogy ahogyan a széleskörűen tanulmányozott és klinikumban használt csontvelői MSC-ek, úgy az érfali MSC-ek is képesek zsír-, csont-, illetve porcsejteké differenciálódni. Az MSC-eknek az International Society for Cellular Therapy (ISCT) által meghatározott kriteriumoknak meg kell felelniük, így meghatározott sejtfelszíni marker expressziós mintázattal kell rendelkezniük. Ezért áramlási citometriával ellenőriztük az endothél, ill. MSC-asszociált markerek, valamint az adhézións molekulák kifejeződését. Hierarchikus klaszterezést követően azt láttuk, hogy a HUVEC-k, vagyis az endothél sejtek jól elkülönülő csoportot alkotnak, ellentétben az MSC-ekkel, amikor is a BM- és SV-MSK-ek nem válnak el élesen egymástól és az SV-MSK-ek sokkal inkább hasonlítanak a csontvelői MSC-ekre, mint az endothél sejtekre. Megállapítottuk továbbá, hogy a CD31 és a CD104 endothél markerek csak a HUVEC sejteken expresszálódtak, míg a CD144 kadherin molekula a HUVEC sejtek mellett alacsony mértékben MSC- sejteken is jelen van. A BM- és SV-MSK-ek egyaránt kifejezik a CD73, CD90 és CD105 MSC markereket, bár a CD90 molekulát kivéve, ezek a markerek a HUVEC sejteken is azonosíthatók. Érdekes módon a CD146 adhézións molekula kifejeződése eltérő volt a két MSC esetben, SV-MSK-ken ugyanis szignifikánsan alacsonyabb mértékben expresszálódt.

4.1.2. SV-MSK-k és BM-MSK-k génexpressziós profiljának vizsgálata

Következő lépésben a csontvelői és érfali MSC-ek génexpressziós profilját hasonlítottuk össze. A microarray adatok alapján megállapítható, hogy a kétféle eredetű MSC génexpressziós mintázata markánsan nem tér el egymástól, de a sejtciklus és onkogének (242 gén), HOX, SOCS, Notch jelátvitel (380 gén), differenciáció és lineage (489 gén), valamint az össejtpotenciál (422 génhez) -biológiai folyamatokkal asszociált csoportokban sikerült több olyan gént azonosítanunk, melyek a két MSC altípusban eltérő kifejeződést mutatnak. Eredményeink azt mutatták, hogy számos gén esetében detektálható szignifikáns eltérés az érfali MSC-kben a csontvelői MSC-khez viszonyítva. Míg az S100A4, FGF9, IL-33, HOXA11,

PODXL, CTSK, CSF1, FGF9, ZFPM2, MME, F2D4, LIF, MGC20647, CXCL12, MCAM, ACAN, LTBPI, BPM2, SMAD3, ALCAM, ITGAV, GDF6, FGF7 gének expressziója szignifikánsan magasabb, addig a SMAD3, CDK6, VCAM1, ACAN, EGR, TGF β 2, IGF2, BMP2, BDNF, JAG1, INHBA, ITGA3, SMAD3, HES1, EFNB2, PTN, PDGFA gének expressziója szignifikánsan alacsonyabb expressziót mutatott SV-MSC-ben a BM-MSC-hez képest. Megállapítható, hogy a különböző szövetekből izolált MSC-ek nagyrészt átfedő, de bizonyos gének, géncsoportok esetén mégis különböző génexpressziós mintázatokkal jellemezhetők.

4.1.3. BM-MSC-k és SV-MSC-k immunmoduláló aktivitása

A következő lépésben összevetettük a csontvelői és érfalból származó MSC immunmoduláló képességét, pontosabban azok hatását mitogénekkal (ConA vagy PHA) aktivált PBMC proliferációjára. Látható, hogy kísérleteink során sejtarány vizsgálatokat is végeztünk. Erdményeink alapján megállapítható, hogy a ConA-val stimulált T-sejtek esetén az őssejtek nem vezettek csökkent T-sejt proliferációhoz, míg a PHA-val stimulált T-sejtek proliferációs rátája minden alkalmazott sejtarány esetén csökkent. Továbbá, az 1:100 MSC-PBMC sejtarány esetén PHA aktiválást követően az SV-MSC-ek a BM-MSC-khez képest szignifikáns mértékben gátolták a kokultúrában a T-sejtek proliferációját. Megállapítható tehát, hogy az SV-MSC-ek igen kifejezett T-sejt proliferációt gátló, immunszuppresszív hatással jellemezhetők.

4.2. II. Rész

4.2.1. Az MSCl sejtek közvetett vagy közvetlen jelenléte az moDS-ek differenciálódása során hatással van az moDS-ek protein termelő képességére

Elsőként igyekeztünk nagy részletességgel feltárni, hogy az MSCl sejtek milyen hatást gyakorolnak az moDS-ek szolubilis mediátor termelő profiljára. Ehhez protein array segítségével vizsgáltuk a kontroll, MSCl-CM, vagy MSCl sejtek jelenlétében differenciáltatott moDS-ek vagy az MSCl sejtek önálló protein termelő profilját. Az MSCl sejtek közvetett és közvetlen jelenléte egyaránt fokozta az moDS-ek IL-19, VCAM-1, Leptin, IL-6, CD14, FGFbasic, IGFBPB, TFF3, Tfr, míg csökkentette az IL-27, Cystatin C, Citináz-3-like, MMP9, PDGF-AB/BB termelését. Az MSCl sejtek közvetlen jelenléte növelte az moDS-ek D vitamin BP, Endoglin, ENA78, GDF-15, GRO- α , IL-24, MCP-3, VEGF, IL-8, IL-10 és IFN γ termelését, csökkentette azonban az FGF-19 és Osteopontin kibocsátását. Az MSCl-CM jelenléte az moDS differenciációja során növelte az moDS-ek FGF-19, Osteopontin, CD31 és IL-18Bpa, csökkentette azonban az ICAM-1 és EMMPRIN termelését. Az MSCl sejtek közvetett illetve közvetlen hatására eltérő profillal jellemezhetők az moDS-ek. Noha voltak mediátorok, melyek termelődését a kondicionált médium és az MSCl sejtek egyaránt fokozták vagy gátolták, azonosítottunk olyan faktorokat is, melyeket az MSCl-CM illetve az MSCl sejtek különbözőképpen szabályoztak. Ilyen például az Osteopontin, melynek termelődését az MSCl sejtek közvetlen jelenléte csökkentette, míg a kondicionált médium jelenlétében fokozódott a szekréciója. Összességében megállapítható, hogy az MSCl sejtek mind közvetett mind közvetlen módon képesek befolyásolni az éretlen moDS-ek gyulladásos és anti-inflammatorikus mediátor termelését.

4.2.2. Az MSCl sejtek megváltoztatják a monocita eredetű sejtek fenotípusát

A következő lépésben az MSCl sejtek moDS-ek fenotípusára gyakorolt hatását tanulmányoztuk. A monociták IL-4 és GM-CSF jelenlétében történő differenciációja során a CD14 molekula expressziója fokozatosan csökken, míg a CD209 molekula és a CD1 család bizonyos tagjainak expressziója nő. Ezen markerek vizsgálatával jó hatékonysággal monitorozható a differenciációs folyamat. Azt találtuk, hogy az MSCl sejtek közvetett és közvetlen módon egyaránt növelték a CD14⁺ moDS-ek arányát, míg az MSCl sejtek nem befolyásolták a CD209 molekulát kifejező sejtek arányát. Azt találtuk azonban, hogy a molekula kifejeződésének mértéke jelentősen csökken az moDS-ek felszínén MSCl sejtek közvetlen jelenlétében. Eredményeinkből az látszik, hogy az MSCl sejtek közvetett és közvetlen módon egyaránt csökkentik a CD1a, b és c molekulák kifejeződését az moDS-ek

felszínén. Azt találtuk, hogy az MSC1 sejtek közvetlen módon szignifikánsan növelik CD80 és PD-L1 antigének kifejeződését az moDS-ek felszínén és szignifikáns mértékben fokozzák az moDS-ek felszínén kifejeződő CD86 molekula expresszióját. Érdekes módon, az MSC1-CM szignifikánsan növeli az moDS-ek felszínén kimutatható HLA-DQ és CTLA-4 molekulák kifejeződését. Vizsgálataink fényt derítettek arra, hogy a monocita differenciáció 4. napjára az MSC-CM-mal kondicionált moDS-ek felszínén magasabb CTLA-4 kifejeződés mérhető. Összességében tehát az MSC1 sejtek és a róluk származó kondicionált médium más fenotípusú monocita-eredetű sejtek kialakulását eredményezi.

4.2.3. Az MSC1-sejtek legalább részben ATRA termelésén keresztül változtatják meg a moDS-k fenotípusos tulajdonságait

Eredményeink alapján az MSC1 sejtek rendelkezhetnek a RAR α ligandum, vagyis az ATRA szintéziséhez szükséges enzimmészettel. Az MSC1 sejtek által potenciálisan termelt RAR α ligandum moDS-ek monocitából történő moDS differenciációra gyakorolt hatását vizsgáltuk úgy, hogy egyes moDS tenyészeteket 1 nM ATRA jelenlétében differenciáltattuk, amelyet a meghatározott kísérleteknél 75 perces inkubáció előzött meg 1 μ M BMS614 specifikus RAR α -antagonistával. Azt találtuk, hogy az ATRA és MSC1-CM csökkentette a CD1a⁺ sejtek arányát, szignifikáns mértékben növelte a CD86 és CTLA-4 expressziót az moDS-ek felszínén, míg a HLA-DQ expresszióját csak az MSC1-CM növelte szignifikáns mértékben. Az antagonista hatásának vizsgálatakor azt találtuk, hogy BMS gátolta az ATRA CD1a expressziót blokkoló hatását, míg az MSC-CM-moDS-ek esetében ez nem figyelhető meg. Továbbá, a BMS gátolta az ATRA és az MSC1-CM CD86 és CTLA-4 expressziót fokozó hatását.

4.2.4. Az MSC1-CM jelenlétében differenciált monocita eredetű sejtek IL-17- és IL-10-termelő T-sejteket aktiváló képessége CTLA-4 függő

A DS-ek fő feladata a T-sejt válasz szabályozása. ELISPOT módszerrel kimutattuk, hogy az MSC1-CM jelenlétében differenciáltatott moDS-ek hozzájárulnak az IL-17 illetve IL-10 citokin termelő T sejtek fejlődéséhez. Amennyiben neutralizáló antitesttel blokkoltuk az MSC1-CM hatására az moDS-ek felszínén megjelenő CTLA-4 molekulát, a DS-ek többé nem voltak képesek kiváltani az IL-17 illetve IL-10 citokineket termelő T-sejtek aktivációját. Látna, hogy az MSC1-CM moDS-ek indukálják a T-sejtek IL-10 és IL-17 termelését, felmerült a kérdés, hogy vajon ugyanazon segítő T-sejt alpopulációk felelősek-e a két citokin termeléséért. Vizsgálati rendszerünkben, intracelluláris citokin festést követően áramlási citometriával kimutattuk, hogy a kétféle citokin ugyanazon T-sejtekből származik.

5. MEGBESZÉLÉS

Az MSC-k – az eredetüktől függetlenül - immunmoduláló aktivitással rendelkeznek. Immunválaszra gyakorolt hatásuk rendkívül összetett és szerteágazó. Az MSC-k közvetlen sejt-sejt interakciók vagy szolubilis mediátorok termelése révén befolyásolhatják az immunsejtek differenciálódását és funkcionális tulajdonságait. Immunszabályozó aktivitásuk azonban nagyban a környezeti tényezők függvénye. Viselkedésüket tehát nagy mértékben befolyásolja az egyén általános egészségi állapota, a sejt forrása, vagyis a szöveti mikrokörnyezet, illetve az izolálást követő *in vitro* tenyésztés körülményei.

Az MSC-k legnagyobb és legismertebb forrása a csontvelő, de egyéb szervekből, szövetekből is izolálhatók, így például erek falából is kinyerhetjük őket. Célul tűztük ki, hogy az eddig nem olyan intenzíven vizsgált érfali MSC-ket karakterizáljuk. Ez azért is nagyon fontos, mert igen nehéz őket elkülöníteni a többi érfalat alkotó sejttípustól. Fontos továbbá, hogy az érfali MSC-ket általában artériák tunica media rétegéből izolálják, jóval kevesebb ismeretanyag gyűlt össze eddig a vénák falában található MSC-ekről. Ezért vizsgálataink során célul tűztük ki könnyen kivitelezhető izolálási technikával kinyert véna-falból származó MSC-ek átfogó vizsgálatát és a széleskörűen használt és jól karakterizált BM-MSK-vel történő összehasonlítását.

Az érfali és csontvelői MSC-ek egyaránt adherens sejtek és hasonló differenciálódási potenciállal jellemezhetők. Az ISCT elvárásainak megfelelően a kétféle MSC hasonló sejtfelszíni antigén expressziós mintázattal rendelkezik és jól elkülöníthető csoportot alkot a kontroll endothél sejtektől. Érdekes módon a CD146 adhéziós molekula kifejeződése eltérő volt a két MSC esetében, SV-MSK-ken ugyanis szignifikánsan alacsonyabb mértékben expresszáldott. *In vitro* és *in vivo* eredmények arra utalnak, hogy az őssejtek felszínén erősebben kifejeződő CD146 molekula asszociált az őssejtek nagyobb plaszticitásával, azonban kisebb regenerációs potenciállal társul. A kétféle eredetű MSC génexpressziós mintázata markánsan nem tért el egymástól, de a sejtciklus és onkogének, HOX, SOCS, Notch jelátvitel, differenciáció és lineage, valamint az őssejtpotenciál-biológiai folyamatokkal asszociált csoportokban sikerült több olyan gént azonosítanunk, melyek a két MSC altípusban eltérő kifejeződést mutatnak. A különböző szövetekből izolált MSC-ek nagyrészt átfedő, de bizonyos gének, géncsoportok esetén mégis különböző génexpressziós mintázatokkal jellemezhetők, mely arra utalhat, hogy az MSC-kre, a lokalizáció függvényében más-más feladatok hárulhatnak, így az MSC-ek alkalmazkodnak az adott szöveti környezethez, illetve az adott szövetben éppen fennálló kondíciókhoz. Az SV-MSK-ek igen kifejezett a BM-MSK-nél erősebb T-sejt proliferációt gátló, immunszuppresszív hatással jellemezhetők. Ez a megfigyelés

alátámaszthatja az érfali MSC-ek szerepét az ereket érintő gyulladásos megbetegedések tüneteinek enyhítésében.

A rendelkezésre álló irodalom és a dolgozatban bemutatott eredmények alapján az MSC-ek sokfélesége nyilvánvaló. Különbségek figyelhetők meg az egyén, a szövetek és a sejtek szintjén egyaránt. Valószínűleg legalább részben ezzel magyarázható, hogy az őssejtek sajátosságait vizsgáló rendszerekből gyakran akár egymásnak ellentmondó következtetések születnek. Egy lehetséges opció a kísérleti körülmények standardizálására, ha vizsgálatainkhoz MSC-sejtvonalakat használunk, vagy azokkal egészítjük ki a primer sejteket alkalmazó kísérleteinket. Kísérleteink további részében mi is egy MSC1 sejtnak nevezett MSC sejtvonalat használtunk. Korábbi kollaborációs munka keretében részt vettünk a sejtvonal karakterizálásában. A vizsgálatok során bebizonyosodott, hogy a humán embrionális őssejtekből differenciáltatott MSC1 sejtek megfelelnek az ISCT által meghatározott MSC kritériumoknak. Jelen munkánk során igyekeztünk feltárni az MSC1 sejtek immunválasz szabályozó képességének háttérében álló mechanizmusokat. Vizsgáltuk az MSC1 sejtek monocitából differenciáltatott dendritikus sejtek differenciációjára kifejtett direkt és indirekt hatásait.

Az MSC1 sejtek mind közvetett mind közvetlen módon és akár ellentétesen képesek befolyásolni az éretlen moDS-ek gyulladásos és anti-inflammatorikus mediátor termelését. A monociták IL-4 és GM-CSF jelenlétében történő differenciációja során a CD14 molekula expressziója fokozatosan csökken, míg a CD209 molekula és a CD1 család bizonyos tagjainak expressziója nő. Ezen markerek vizsgálatával jó hatékonysággal monitorozható a differenciációs folyamat. Azt találtuk, hogy az MSC1 sejtek közvetett és közvetlen módon egyaránt növelték a CD14⁺ moDS-ek arányát, míg az MSC1 sejtek nem befolyásolták a CD209 molekulát kifejező sejtek arányát. Azt találtuk azonban, hogy a molekula kifejeződésének mértéke jelentősen csökken az moDS-ek felszínén MSC1 sejtek közvetlen jelenlétében. Vizsgálatainkat egyéb mérésekkel is kiegészítettük, melyek az irodalmi adatoknak megfelelően arra utalnak, hogy az MSC1 sejtek közvetlen jelenlétében differenciálódó monociták M2 makrofág típusú sejtekké fejlődnek, míg az MSC1-CM jelenlétében differenciálódó sejtek inkább a dendritikus sejtekre jellemző fenotípussal rendelkeznek. Ennek háttérében az állhat, hogy a differenciációs folyamat közben a két sejt között kapcsolat alakul ki az adhézións molekulák kapcsolódásán keresztül. Ismert, hogy az MSC-ken expresszálandó VCAM-1 és a monocitákon kifejeződő VLA-4 interakciója részt vesz a monociták makrofág irányú differenciációjának beindításában.

Az MSC1 sejtek közvetlen módon szignifikánsan növelik CD80 és PD-L1 antigének kifejeződését az moDS-ek felszínén, az MSC1 sejtek szignifikáns mértékben fokozzák az moDS-ek felszínén kifejeződő CD86 molekula expresszióját. Érdekes, hogy az egyébként T-sejteken megjelenő CTLA-4 ko-inhibitor molekula bizonyos kórképek, például karcinómában szenvedő betegek esetében mieloid eredetű sejteken is kifejeződhet. Alapesetben az APC-által expresszált CD80 ill. CD86 molekulák a T sejtek által kifejezett CD28 molekulához kötődik. Ez az interakció a T sejt aktivációjához vezet. A CTLA-4 molekula interakciós partnerei azonban szintén a B7 molekulacsalád tagjai, így a CTLA-4 a CD28 molekula kompetitora. Vagyis B7 kötése a T sejt válasz gátlásához vezet. Érdekes módon, az MSC1-CM szignifikánsan növeli az moDS-ek felszínén kimutatható HLA-DQ és CTLA-4 molekulák kifejeződését. Vizsgálataink fényt derítettek arra, hogy a monocita differenciáció 4. napjára az MSC-CM-mel kondicionált moDS-ek felszínén magasabb CTLA-4 kifejeződés mérhető. A genetikailag módosított, terápiásan használt CTLA-4-Ig molekulát expresszáló moDS-ek részt vesznek az autoimmun betegségek vagy a transzplantációt követően kialakuló krónikus gyulladásal járó kórképek tüneteinek enyhítésében. A mechanizmus hátterében részben ezen módosított dendritikus sejtek azon képessége áll, hogy indukálják a Th17 sejtek IL-10 citokin termelését. Az MSC1-CM jelenlétében differenciált monocita eredetű sejtek IL-17- és IL-10-termelő T-sejteket aktiváló képessége a mi eredményeink alapján is CTLA-4 függő folyamatnak bizonyult.

A következő lépésben az volt a kérdésünk, vajon az előbb ismertetett fenotípusos változásokhoz szükség van-e arra, hogy az MSC1-CM már a differenciációs folyamat nulladik napjától jelen legyen a kultúrában. Eredményeink azt mutatták, hogy az MSC1 sejtekről származó kondicionált médium nem váltotta ki a CTLA-4 expressziót az moDS-ek felszínén, amennyiben a felülszóval már differenciáltatott sejteket kezeltünk. Felmerült tehát bennünk a kérdés, hogy vajon milyen faktorok lehetnek jelen az MSC1 sejtek felülszójában, melyek az moDS differenciáció korai szakaszában meghatározóak lehetnek. Ismert, hogy a monociták differenciációját számos, a környezetükben lévő faktor szabályozhatja, mint növekedési faktorok, citokinek, mikrobák, metabolitok valamint az étrend egyes összetevői. Ilyen az A vitamin, vagy más néven, retinol. A retinol két nagyon fontos aktív metabolit prekursora, melyek a retinal és a retinsav (ATRA). A retinsav RAR és RXR magreceptorokhoz kötődik szabályozva ezzel számos potenciális target gén transzkripcióját az moDS-ek differenciációja során. Számos sejtípus került már azonosításra, melyek elsősorban a szöveti lokalizációtól függő módon képesek ATRA-t termelni. Az irodalomban ismertetésre kerültek a bél lamina propriában, illetve a peritóneumban olyan sztróma sejtek, melyek ATRA-t állítanak elő, ezzel

befolyásolva az egyéb szöveti rezidens sejtek differenciációját és funkcionális aktivitását. Az irodalomból ismert, hogy a magreceptorok kiemelt szerepet játszanak a mieloid sejtek fejlődése során is. Eredményeink alapján pedig az MSCI sejtek által termelt potenciális RAR α ligandum meghatározza a monocitából differenciálódó DS-ek fenotípusát.

Megfigyeléseink együttesen új mechanizmusokat szolgáltatnak az MSCI sejtek moDS-k differenciálódási és T-limfocita polarizációs képességére gyakorolt hatását szabályozó molekuláris háttér bővítéséhez. Eredményeink alapján MSC-k által kifejtett immunreguláció több irányból, több mechanizmuson keresztül, akár eddig nem ismert indirekt módon valósulhat meg, mely új perspektívákat nyithat meg a rákos, autoimmun vagy egyéb gyulladásos betegségekben szenvedő betegek kezelésében.

6. ÖSSZEFOGLALÓ

A mezenchimális őssejtek ígéretes terápiás lehetőséget kínálnak. Ez részben relatíve széles, multipotens differenciálódási képességének, részben pedig jelentős immunmoduláló képességének köszönhető. Számos kórkép hátterében nem megfelelően szabályozott immunválasz húzódik meg, ami pedig a sejtek között zajló kommunikációs zavar következménye lehet. A szöveti rezidens sejtek, mint az MSC-ek meghatározó szerepet töltenek be a homeosztázis fenntartásában, képesek lehetnek azonban a kialakult patológiás állapotok támogatására is.

Bár legnagyobb számban a csontvelőben fordulnak elő, az MSC-ek számos szövet, így az erek esszenciális sejtes alkotóelemei is. Az MSC-ket nem kezelhetjük egységes populációként, a különböző egyénekből származó sejtek ugyanis különbözhetnek fenotípusukban, epigenetikai hátterükben, életképességükben és a termelt oldott faktorok minőségében. A nagyfokú diverzitás megismerése érdekében célul tűztük ki egy izolálási módszer optimalizálását az érfalakban található MSC-ek (SV-MSCs) kinyerésére. Megfigyeléseink alapján az izolálást követően a sejteket karakterizálnunk kell, ugyanis az MSC-ek fenotípusos tulajdonságaikban átfedést mutatnak az erek endothél rétegében és az érfalak subendotheliális régiójában lokalizált egyéb sejttypusokkal. A részletes karakterizálás mellett az SV-MSCs-eket összehasonlítottuk a széles körben használt és jól ismert csontvelői MSC-vel (BM-MSCs). Az összehasonlító analízis során számos hasonló tulajdonságot találtunk, feltárássra kerültek azonban különbségek is, melyek összességében alátámasztják az eltérő állapotban lévő donorokból nyert, illetve azok különböző szöveteiből izolált MSC-ek alapos karakterizálásának fontosságát.

Az MSC sejtvonalakkal történő kísérletes munka segíthet a frissen izolált MSC-ek diverzitásából fakadó nehézségek kiküszöbölésére. Munkánk során vizsgáltuk az MSC1 sejtek direkt és indirekt hatását a monociták dendritikus sejtekké (DS) történő differenciációjára. A DS-ek hídként teremtenek kapcsolatot az öröklött és szerzett immunválasz között. Rendkívül plasztikus sejtekről lévén szó, a monociták differenciációja számos ponton és módon befolyásolható, ezáltal biztosítva a monocitákból differenciálódó sejttypusok alkalmazkodását az adott szöveti környezethez. Az MSC1 sejtek indirekt módon, ATRA (RAR α ligandum) termelés révén elősegítik CTLA-4 molekulát kifejező DS-ek kialakulását, melyek képesek kiváltani az allogén, naiv T-limfociták IL-10 és IL-17 termelő sejtekké történő polarizációját.

Munkánk során új mechanizmusokat sikerült feltárni, melyek szerepet játszanak az MSC-ek által kifejtett immunmoduláció során, és felhívhatják a figyelmet a sejt-mentes őssejtterápiák előnyeire.

7. PUBLIKÁCIÓK



**DEBRECENI
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400

Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/309/2021.PL
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Türk-Mázló Anett

Doktori Iskola: Molekuláris Sejt- és Immunbiológia Doktori Iskola

MTMT azonosító: 10055612

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Türk-Mázló, A., Kovács, R., Miltner, N., Tóth, M., Veréb, Z., Szabó, K., Bacskai, I., Pázmándi, K. L., Apáti, Á., Bíró, T., Bene, K., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-/IL-10-producing T cells via CTLA-4. *iScience*. 24 (4), 1-25, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.isci.2021.102312>
IF: 4.447 (2019)
2. Veréb, Z., Türk-Mázló, A., Szabó, A., Pólska, S., Kiss, A., Litauszky, K., Koncz, G., Boda, Z., Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: Vessel Wall-Derived Mesenchymal Stromal Cells Share Similar Differentiation Potential and Immunomodulatory Properties with Bone Marrow-Derived Stromal Cells. *Stem Cells International*. 2020, 1-16, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2020/8847038>
IF: 3.869 (2019)

További közlemények

3. Varga, Z., Rácz, E., Türk-Mázló, A., Korodi, M., Szabó, A., Molnár, T., Szőör, Á., Veréb, Z., Bácsi, A., Koncz, G.: Cytotoxic activity of human dendritic cells induces RIPK1-dependent cell death. *Immunobiology*. 226 (1), 1-7, 2021.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2020.152032>
IF: 2.788 (2019)
4. Varga, Z., Molnár, T., Türk-Mázló, A., Kovács, R., Jenei, V., Kerekes, K., Bácsi, A., Koncz, G.: Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis. *Cancer Immunol. Immunother.* 8, 1-15, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1007/s00262-020-02623-7>
IF: 5.442 (2019)





5. Nánási, P. P. i., Imre, L., Firouzi Niaki, E., Bosire, R., Mocsár, G., **Türk-Mázló, A.**, Ausio, J., Szabó, G.: Doxorubicin induces large-scale and differential H2A and H2B redistribution in live cells.
PLoS One. 15 (4), e0231223-, 2020.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0231223>
IF: 2.74 (2019)
6. Bene, K., Tóth, M., Al-Taani, S., Tóth, L., **Türk-Mázló, A.**, Rajnavölgyi, É., Bácsi, A.: A humán bélmikrobiom szerepe fiziológiás és patológiai immunológiai folyamatokban.
Immunol. Szle. 11 (2), 14-24, 2019.
7. Molnár, T., **Türk-Mázló, A.**, Tslaf, V., Szöllősi, A. G., Emri, G., Koncz, G.: Current translational potential and underlying molecular mechanisms of necroptosis.
Cell Death Dis. 10 (11), 1-21, 2019.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1038/s41419-019-2094-z>
IF: 6.304
8. Bosire, R., Nánási, P. P. i., Imre, L., Dienes, B., Szöör, Á., **Türk-Mázló, A.**, Kovács, A., Seidel, R., Vámosi, G., Szabó, G.: Intercalation of small molecules into DNA in chromatin is primarily controlled by superhelical constraint.
PLoS One. 14 (11), 1-18, 2019.
DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0224936>
IF: 2.74
9. Fekete, T., Sütő, M. I., Bencze, D., **Türk-Mázló, A.**, Szabó, A., Biró, T., Bácsi, A., Pázmándi, K. L.: Human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells display distinct metabolic profile upon RIG-I activation.
Front. Immunol. 9, 1-32, 2018.
IF: 4.716
10. **Türk-Mázló, A.**, Rajnavölgyi, É.: A CTLA-4 rendszer immunológiai és immunonkológiai szerepe: kétélű fegyver?
Immunol. Szle. 9 (1), 18-22, 2017.
11. Halász, L., Karányi, Z., Boros-Oláh, B., Kuik-Rózsa, T., Sipos, É., Nagy, É., Mosolygó, Á., **Türk-Mázló, A.**, Rajnavölgyi, É., Halmos, G., Székvölgyi, L.: RNA-DNA hybrid (R-loop) immunoprecipitation mapping: an analytical workflow to evaluate inherent biases.
Genome Res. 27, 1063-1073, 2017.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1101/gr.219394.116>
IF: 10.101





12. Bacskai, I., **Türk-Mázló, A.**, Kis-Tóth, K., Szabó, A., Panyi, G., Sarkadi, B., Apáti, Á., Rajnavölgyi, É.: Mesenchymal stromal cell-like cells set the balance of stimulatory and inhibitory signals in monocyte-derived dendritic cells.
Stem Cells Dev. 24 (15), 1805-1816, 2015.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1089/scd.2014.0509>
IF: 3.777
13. Kis-Tóth, K., Bacskai, I., Gogolák, P., **Türk-Mázló, A.**, Szatmári, I., Rajnavölgyi, É.: Monocyte-derived dendritic cell subpopulations use different types of matrix metalloproteinases inhibited by GM6001.
Immunobiology. 218 (11), 1361-1369, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2013.06.012>
IF: 3.18

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 50,104

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre):
8,316**

A DEENK a Jelölt által az iDEa Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudománymetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2021.05.18.



8. KULCSSZAVAK

Csontvelő eredetű Mesenchymal Stem / Stromal Cell, Saphena erekből származó Mesenchymal Stem / Stromal Cell, Monocyta, differenciálódás, Dendritic sejt, Mesenchymal Stem / Stromal Cell-szerű sejt, össejtvonal, CTLA-4, all-trans retinsav / ATRA, RAR, T-sejt, IL-10, IL-17

9. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönöm a töretlen támogatást, segítőkészséget, tanítást és rengeteg tanulási lehetőséget jelenlegi és volt témavezetőimnek, Prof. Dr. Bácsi Attilának és Prof. Dr. Rajnavölgyi Évának. Hálás vagyok Pappné Dr. Bacskai Ildikónak, Dr. Veréb Zoltánnak, Gregus Andreának és Dr. Koncz Gábornak az Immunológiai Intézetben töltött évek alatt nyújtott önzetlen tanácsaikért és jelentős hozzájárulásukért ahhoz, hogy a disszertációm vagy az annak alapjául szolgáló cikkek megszülethessenek. Külön köszönetet illeti Dr. Bene Krisztiánt, Tóth Mártát, Dr. Szabó Krisztinát, Dr. Szendi-Szatmári Tímeát, Dr. Czipa Eriket, Dr. Tálás Lászlót, Viski Vivient és Dr. Markovich Arnoldot azért, mert segítették szakmai fejlődésem, és mert nagyon kitartó barátoknak bizonyultak. Köszönetet szeretnék mondani az Immunológiai Intézet minden általam ismert volt és jelenlegi tagjának a rengeteg adminisztratív segítségért, a labormunka során nyújtott segítségért és a nagyon hasznos szakmai beszélgetésekért. Hálás vagyok lelkes hallgatóimnak, Kocsis Viktória Katalinnak, Bíró-Kovács Ramónának, Miltner Noéminek, Magi Erzsébetnek, Maria Hedman-nak, Shlomie Brisco-nak és Burai Sárának a közös munkáért, a laborban nyújtott segítségükért érdekes kérdésfelvetéseikért. Végül, de nem utolsósorban, köszönettel tartozom családomnak szeretetükért, türelmükért és tanulmányim során nyújtott támogatásukért. Külön köszönetet szeretnék mondani férjemnek, Lacinak, aki hosszú évek óta támogat és szeret jóban rosszban.

A munka megszületését támogató projektek:

- TAMOP-4.2.2.A-11/1 / KONV-2012 0023 projekt
- Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatal (NKFIH PD132570, NK 101538 és NN 114423, K)
- GINOP-2.3.2-15-2016-00050
- UNKP-17-1, UNKP-17-3, UNKP-17-4 és UNKP-18-3
- EFOP-3.6.1-16-2016-00008 projekt (az Európai Unió és az Európai Regionális Fejlesztési Alap társfinanszírozásával)
- 20391-3 / 2018 / FEKUSTRAT
- MTA MTA-DE Sejtbiológiai és Jelzésekutató Csoportja

Konferencia előadások:

Anett Mázló, *Novel mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immune suppression*, 8th Winter Symposium of Molecular Cell- and Immunobiology Doctoral School, Debrecen, Magyarország, 2015

Anett Mázló, *New means how mesenchymal stromal cell like cells can modulate dendritic cell functions*, 9th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, Magyarország, 2016

Anett Türk-Mázló, *Novel mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immune suppression*, 3rd Meeting of Middle-European Societies for Immunology and Allergology, Budapest, Hungary, 1-3. december, 2016

Anett Türk-Mázló, *Novel mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immune suppression*, 10th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, Magyarország, 2017

Anett Türk-Mázló, *Role of CTLA-4 in mesenchymal stem cell-mediated immune modulation*, 11th Molecular Cell and Immune Biology Winter Symposium, Debrecen, Magyarország, 2018

Türk-Mázló Anett, *Felnőtt szöveti őssejtek „checkpoint” mechanizmusok szabályozása révén megvalósuló immunválaszokat meghatározó működésének molekuláris biológiai vizsgálata*, ÚNKP Konferencia, Magyarország, Debrecen, 2018. június 18.

Türk-Mázló Anett, *Mezenhimális őssejtek dendritikus sejtek keresztprezentáló képességére gyakorolt hatásának vizsgálata*, ÚNKP Konferencia, Magyarország, Debrecen, 2019. június 17.

Anett Türk-Mázló, *Differences in the sensitivity of classically and alternatively activated macrophages to TAK1 inhibitor-induced necroptosis*, International Cancer Research Conference, Dec 15-16, 2020

Válogatott poszter prezentációk:

Anett Mázló, Ildikó Bacskai, Veronika Makó, Ágota Apáti, Balázs Sarkadi, Éva Rajnavölgyi: *Inhibitory role of NLRX1 in human dendritic cells immunosuppressed by MSCs*, 9th Winter Symposium of Molecular Cell- and Immunobiology Doctoral School, Galyatető, Magyarország, 2014

Anett Mázló, Szilárd Poliska, Ildikó Bacskai, Ágota Apáti, Balázs Sarkadi, Éva Rajnavölgyi: *Novel mechanism of mesenchymal stem cell-mediated immune suppression*, 43th Conference for Hungarian Society of Immunology (MIT), Velence, Magyarország, 2014

Anett Mázló, Szilárd Poliska, Ildikó Bacskai, Noémi Miltner, Ágota Apáti, Éva Rajnavölgyi: *Novel mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immune suppression*, 4th European Congress of Immunology, Bécs, Ausztria, 2015

Anett Türk-Mázló, Szilárd Poliska, Ildikó Bacscai, Ágota Apáti, Éva Rajnavölgyi: *Mesenchymal stromal cell like cells could regulate the immune response*, 44th Symposium of Hungarian Society for Immunology, Velence, Magyarország, 14-16. October, 2015

Anett Türk-Mázló, Ramóna Kovács, Szilárd Poliska, Ágota Apáti, Éva Rajnavölgyi: *Novel mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immune suppression*, 45th Symposium of Hungarian Society for Immunology, Velence, Magyarország, 19-21. October, 2016

Anett Türk- Mázló, Szilárd Poliska, Krisztián Bene, Márta Tóth, Ramóna Kovács, Erzsébet Magi, Ágota Apáti, Éva Rajnavölgyi: *Role of CTLA-4 in mesenchymal stem cell-mediated immune modulation*, 46th Symposium of Hungarian Society for Immunology, Velence, Magyarország, 18-20. October, 2017

Anett-Türk Mázló, Szilárd Póliska, Krisztián Bene, Márta Tóth, Ramóna Kovács, Erzsébet Magi, Ágota Apáti, Éva Rajnavölgyi: *Role of CTLA-4 and PD-L1 in mesenchymal stem cell-mediated immune modulation*, 15th International Symposium on dendritic cells, 10-14 June 2018, Aachen, Germany

Anett-Türk Mázló, Márta Tóth, Ramóna Kovács, Krisztina Szabó, Ágota Apáti, Tamás Bíró, Krisztián Bene, Attila Bácsi, Éva Rajnavölgyi: *MSCs have the potential to induce the generation of CTLA-4+ human moDCs*, 47th Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology, 17-19th October 2018, Bükkfűrdő

Ramóna Bíró-Kovács, Anett Türk-Mázló, Yair Tzikinovsky, Attila Bácsi, Éva Rajnavölgyi: *The effect of soluble factors produced by tumor cells on the differentiation of dendritic cells*, 47th Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology, 17-19th October 2018, Bükkfűrdő

Márta Tóth, Anett Türk-Mázló, Krisztián Bene, Szabolcs Muzsai, Dorottya Horváth, Éva Rajnavölgyi, Attila Bácsi: *The effects of lactobacterial metabolites on the antiviral functions of mesenchymal stromal cells*, 48th Annual Meeting of the Hungarian Society for Immunology, 16-18th October 2019, Bükkfűrdő

Türk-Mázló Anett, Bíró-Kovács Ramóna, Shlomie Briscoe, Bácsi Attila, Koncz Gábor: *Tumor sejtvonalak által termelt oldott faktorok dendritikus sejtek differenciációjára gyakorolt hatásának összehasonlító vizsgálata*, Magyar Immunológiai Társaság 49. Vándorgyűlése, 2020. október 7-9.