

DEBRECENI EGYETEM
ÁLTALÁNOS ORVOSTUDOMÁNYI KAR
Immunológiai Intézet

**Resolvin-D1 és HMGB1 hatása a mezenchymális sztrómasejtek immunmoduláló
képességére**

37. OTDK Biológia Szekció



Homoki Eszter

Debreceni Egyetem, Biológia Bsc, III. évfolyam

Dr. Türk-Mázló Anett

Témavezető

Prof. Dr. Bácsi Attila

Intézetvezető

Debrecen, 2023

Tartalom

1. Rövidítések jegyzéke.....	3
2. Absztrakt	5
3. Bevezetés.....	6
3.1 Immunrendszer	6
3.1.1 Immunrendszer sejtjei	6
3.2 Dendritikus sejtek.....	7
3.3 Mezenchymális őssejtek.....	9
3.2.1 Extracelluláris vezikulumok	12
3.4 Mezenchymális őssejtek dendritikus sejtekre gyakorolt hatása	12
3.5 HMGB1, resolvin-D1 szintézise, hatásai	13
4. Célkitűzés	16
5. Anyagok és módszerek.....	17
5.1 Monocita szeparálás, dendritikus sejt differenciáltatás	17
5.2 Mezenchymális sztróma szerű sejtek és csontvelői őssejtek tenyésztése.....	18
5.3 Kísérleti rendszer bemutatása.....	19
5.4 Enzim kötött immunszorbens esszé (ELISA)	20
5.5 A sejtek immunfluoreszcenciás jelölése áramlási citometriás vizsgálathoz.....	21
5.6 Statisztikai analízis	22
6. Eredmények.....	23
6.1 Különböző módokon prekondicionált MSC-ek sejtfelszíni markereinek vizsgálata.....	23
6.2 Prekondicionált MSC-ek citokintermelésének vizsgálata	25
6.3 MSC-ekről származó kondicionált médium (MSC-KM) hatása moDC-ek fenotípusára.....	27
6.4. MSC-KM hatása moDC-ek citokintermelésére.....	32
7. Diskusszió.....	35
8. Összegzés	37
9. Köszönetnyilvánítás	38
10. Irodalomjegyzék	39

1. Rövidítések jegyzéke

APC- Allophycocyanin

APC- Antigen-Presenting Cell- Antigén prezentáló sejt

BM-MSC- Csontvelői (bone marrow) mesenchymális őssejt

CD- Cluster of differentiation

DAMP- Danger Associated Molecular Pattern-Veszély asszociált molekuláris mintázat

DC- Dendritikus sejt

DHA- Dokozahexaénsav

DMEM- Dulbecco's Modified Eagle Medium

EDTA- Etilén-diamin-tetraecetsav

ELISA- Enzyme Linked Immunosorbent Assay

EV- Extracelluláris vezikulum

FACS- Fluorescence activated cell sorting

FCS- Fötális borjú szérum

FITC- Fluorescein Isothiocyanate

GM-CSF- Granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor

HLA- Humán leukocita antigén

HMGB1- High Mobility Group Box 1

HSP- Hő sokkfehérje

IFN- Interferon

IG- Immunglobulin

IL- Interleukin

LOX- Lipoxigenáz

LPS- Lipopoliszacharid

MACS - Mágnes aktivált sejtszortolás

MAPK - Mitogén aktivált protein kináz

MHC- Major Histocompatibility Complex- Fő hisztokompatibilitási komplex

moDC- Monocita eredetű dendritikus sejt

MSC- Mesenchymal Stem/Stromal Cell - Mezenhimális ősztróma sejt

MSC-KM- Mezenchymális őssejtről származó kondicionált médium

MSCI- Mesenchymal Stem/Stromal Cell like cell - Mezenhymális ősztróma-szerű sejt

NF- κ B- Nukleáris faktor- κ B

NK-sejt- Natural Killer sejt- Természetes ölő sejt

PAMP- Pathogen Associated Molecular Pattern- Patogén asszociált molekuláris mintázat

PBS- Foszfátpufferolt sóoldat
PD-L- Programmed Death-Ligand- Programozott sejthalál ligandum
PE- Phycoerythrin
PGE- Prostaglandin E
Poly(I:C)- Polyinosinic:polycytidylic acid
PRR- Pattern Recognition Receptor- Mintázat felismerő receptor
RNS- Ribonukleinsav
ROS- Reaktív oxigén gyök
RvD- Resolvin-D
SAMP- a DAMP-ok szuppresszorai
SPM- Speciális pro-rezolváló mediátor
Tc-sejt- Citotoxikus T-sejt
TGF- Transforming growth factor
Th-sejt- Segítő T-sejt
TLR- Toll-like receptor
TNF- Tumor nekrosis faktor

2. Absztrakt

Bevezetés

A mezenchymális őssejtek testünk szinte minden szövetéből izolálható multipotens sejtek, melyek a regeneráció mellett fontos szerepet játszanak a homeosztázis fenntartásában különböző szolubilis faktorok, valamint direkt sejt-sejt kontaktus révén. Jelentőségüket bizonyítja, hogy nem megfelelő működésük összefüggésbe hozható olyan betegségekkel, mint a cukorbetegség, lupusz, pikkelysömör, reumás ízületi gyulladás. Gyulladásnál a szöveti környezetben jelenlevő gyulladás-asszociált anyagok hathatnak működésükre, meghatározva effektor funkcióikat. Napjainkban az őssejt terápia ígéretes gyógyítási módszer, ám szükség van a mechanizmus mélyebb megértésére, ezzel fejlesztve hatékonyságát.

Célkitűzés

Kutatásunk egyik célja, hogy két, a szakirodalomban alapvetően ellentétes hatással jellemzett molekula - a HMGB1 és resolvin-D1 - hatását vizsgáljuk a mezenchymális őssejtek immunmoduláló tulajdonságára fenotípusos változásuk, illetve citokintermelésük megváltozásának detektálása révén. Ezt követően megfigyeljük, hogyan hat az ilyen módon kondicionált mezenchymális őssejtekből származó felülúszó az immunválasz szabályozásában kulcsfontosságú szerepet betöltő dendritikus sejtekre.

Eredmények

Vizsgálataink során a kezelések hatására különbségeket találtunk a BM-MSC-ek és MSC1 fenotípusában, citokintermelésében, illetve a róluk származó kondicionált médium dendritikus sejteket befolyásoló tulajdonságában. Kísérleteink további ismétlést és részletesebb tanulmányozást igényelnek, de a jövőben hozzájárulhatnak az őssejt terápia hatékonyságának javításához.

3. Bevezetés

3.1 Immunrendszer

Immunrendszerünk fő feladata, hogy az idegen és veszélyes anyagoktól megvédje a szervezetünket, azokat felismerje, semlegesítse, eltávolítsa. Két fő egységből tevődik össze, melyek folyamatos együttműködése biztosítja a szervezet számára a megfelelő védelmet: ezek a veleszületett és a szerzett immunrendszer. Alapvető különbség a kettő között, hogy a veleszületett immunitás gyors, szinte azonnal reagál, viszont ez az immunválasz nem változik az idő során, ugyanolyan intenzitású lesz az adott kórokozóval való első találkozásnál, mint ugyanezzel a kórokozóval való többszöri találkozásnál, tehát nem beszélhetünk az általános értelemben vett immunmemóriáról (1). Fontos megemlíteni azt is, hogy a veleszületett immunitásnál a felismerés nem antigén-specifikus, mintázat felismerő receptorokkal (*Pattern Recognition Receptors –PRR*) történik, ami DAMP-okat (*DAMP- danger associated molecular pattern*) és PAMP-okat (*PAMP- pathogen associated molecular pattern*) ismer fel. A DAMP-ok veszély asszociált mintázatok, a PAMP-ok pedig evolúciósan konzervált, patogénekre jellemző mintázatok, mint például a lipopoliszacharid, lipoteikol sav, mannánok vagy a duplaszálú RNS (1). A szerzett immunrendszer ezzel szemben lassúbb, napok telhetnek el az immunválaszig, viszont az intenzitása javul, van immunmemória és nagy előnye, hogy a felismerés antigén-specifikus (1).

3.1.1 Immunrendszer sejtjei

A veleszületett immunrendszer sejtjei a monociták, makrofágok, DC-ek (*DC- dendritikus sejt*), hízósejtek, bazofil, eozinofil és neutrofil granulociták, valamint az NK-sejtek (*NK-természetes ölő sejt*). A vérkeringésben megtalálható monociták a szövetekbe kilépve makrofágokká, illetve DC-ekké differenciálódnak. Előbbiek funkcióikat tekintve hatékony fagocita sejtek, részt vesznek továbbá a patogének eliminációjában és mindemellett professzionális antigén prezentáló sejtek. Citokintermelés révén serkentik az immunválaszt. Az általuk termelt TNF- α (*TNF - tumor nekrosisz faktor*), IL-6 és IL-12 (*IL- interleukin*) citokinek kulcsfontossággal bírnak az akut gyulladás beindításánál, valamint az adaptív immunrendszer sejtjeinek aktiválása során (2). Hasonló feladatokkal rendelkeznek a DC-ek is, de elsődleges feladatuk nem a kórokozó eliminálása, hanem fagocitózis után azok bemutatása az adaptív immunrendszernek és ezzel a T-sejtek aktiválása (*Rajnavölgyi Éva, Magyar Tudomány • 2003/4*). A neutrofil granulocita a vérben legnagyobb mennyiségben jelenlevő fehérvérsejt, a veleszületett immunrendszer harmadik fagocitálni képes sejtcsoportha. A vérkeringésből kilépve a gyulladás helyére érkezve hatékonyan pusztítják el a kórokozókat (1). Az

eozinofilek fő szerepe a szervezet paraziták elleni védelmében van. A hízósejteknek és bazofil granulocitáknak allergiás reakcióknál van jelentőségük. Az NK-sejtek a vírussal fertőzött és a tumoros sejteket pusztítják el perforin és granzim segítségével (3).

Az adaptív immunrendszer sejtjes résztvevői a T- és B-sejtek. Mindkét sejttípus specifikus antigén receptorokat hordoz. Ha a receptor találkozik a neki megfelelő antigénnel, a sejtek osztódni és differenciálódni kezdenek (1). A fehérje típusú antigének felismerésére specializálódott T-sejteken belül megkülönböztetünk CD4+ segítő T-sejteket és CD8+ citotoxikus T-sejteket (*CD- cluster of differentiation*), melyek bár együttműködve, de különböző feladatokat látnak el. A citotoxikus T-sejtek a minden magvas sejt által expresszált MHCI-peptid komplexek (*MHC- fő hisztokompatibilitási komplex*) révén ismerik fel a vírussal fertőzött, illetve a tumoros sejteket, majd citotoxicitásuk révén elpusztítják azt. A segítő T-sejtek feladata az immunválasz elindításában, szabályozásában és az antigén eliminálásának segítésében van, ők a hivatásos antigén prezentáló sejtek által bemutatott MHCII-peptid komplexet ismerik fel (1). A T-sejtekkel ellentétben a B-sejtek nemcsak fehérjetermészetű antigéneket képesek felismerni, hanem eltérő természetű antigéneket, többek között szénhidrátokat, lipideket, nukleinsavakat is. A B-sejtek aktivációjuk után plazmasejteké differenciálódnak és különböző típusú, a felismerő receptorral azonos specificitású ellenanyagokat termelnek. Ezek izotípusa (IgA, IgM, IgD, IgG, IgE) meghatározza azok effektor mechanizmusait (4).

3.2 Dendritikus sejtek

Hivatásos antigén prezentáló sejtnek a dendritikus sejtek a külső környezetből felvett anyagokat feldolgozzák, MHCII-peptid komplex révén sejt felszínükre helyezik, majd a CD4+ Th-sejteknek (*Th- segítő T-sejt*) bemutatják azt. Emellett képesek mind a naiv Th-, mind a Tc-sejtek (*Tc-citotoxikus T-sejt*) aktiválására és ezáltal celluláris immunválasz kiváltására keresztprezentáció révén. Rengeteg sejt felszíni receptoruknak köszönhetően képesek különbséget tenni a saját, egészséges, illetve a nem jól működő sejtek között, valamint mintázatfelismerő képességük lehetővé teszi, hogy a patogéneket is felismerjék a rájuk jellemző patogén asszociált molekuláris mintázatok segítségével. A dendritikus sejteket a legjobb antigénprezentáló sejtekként tartják számon, melyek emiatt az immunterápiák ígéretes eszközeiként szolgálnak (*Rajnavölgyi Éva, Magyar Tudomány • 2003/4*).

A laboratóriumban *in vitro*, monocitákból differenciáltatott DC-ek a bőrben és nyálkahártya-felszínek alatt jelenlevő Langerhans-sejtekhez, illetve a nem limfoid szövetekben található intersticiális DC-ekhez hasonlóak viselkedésükben. Amikor gyulladásos citokinek,

patogénekből származó komponensek, bizonyos anyagcseretermékek vagy bomlástermékek hatására aktiválódnak, akkor jelentős fenotípusos és funkcionális változáson mennek keresztül (Rajnavölgyi Éva, Magyar Tudomány • 2003/4). Elhagyják a szöveteket és a környező nyirokcsomókba vándorolnak, ahol megtörténik a T-sejtek aktiválása. Aktivációt követően fokozódik az MHC és kostimulációs (CD80, CD86) molekulák sejtfelszíni expressziója (5). Ezeken kívül az aktivált DC-ek olyan mediátorokat is termelnek, amik a T-limfociták effektor sejtje történő differenciációját és polarizációját segítik elő, ilyen például az IL-12 citokin (5).

T-sejt polarizációt szabályozó citokin	Támogatott T-sejt polarizációs irány
IL-12*, IFN- γ *	Th-1
IL-10*, IL-4, IL-5, IL-13	Th-2
IL-5*, IL-23*, TGF- β *	Th-17
IL-2, TGF- β *	Treg
IL-21, IL-6*, IL-12*	Tfh

1. táblázat Különböző T-sejt polarizációs útvonalakat támogató citokinek. A táblázat citokineket és az általuk támogatott T-sejt polarizációs útvonalakat foglalja magába, „*”-gal jelölve a dendritikus sejtek által is termelt citokineket. (IL- immunglobulin, IFN- interferon, TGF- transforming growth factor, Th- segítő T-sejt, Treg- regulátor T-sejt, Tfh- follikuláris segítő T-sejtek)(6-10)

Laboratóriumi körülmények között lehetőségünk van a fertőzések modellezésére szintetikus, illetve tisztított PRR ligandumok használatával (11).

PAMP	Receptora	Modellezett patológiás állapot
PAM-3	TLR2	bakteriális fertőzés
LPS	TLR4	bakteriális fertőzés
Poly(-I:C)	TLR3	duplaszálú RNS-vírusfertőzés
CL075	TLR8	vírusfertőzés
Imiquimod	TLR7, TLR8	vírusfertőzés

2. táblázat Laboratóriumban használt PRR ligandumok, azok receptorai és a segítségükkel modellezett fertőzések. A táblázat néhány laboratóriumi körülmények között gyakran használt PRR ligandumot mutat be, megnevezve azok receptorát és az általuk modellezett patológiás

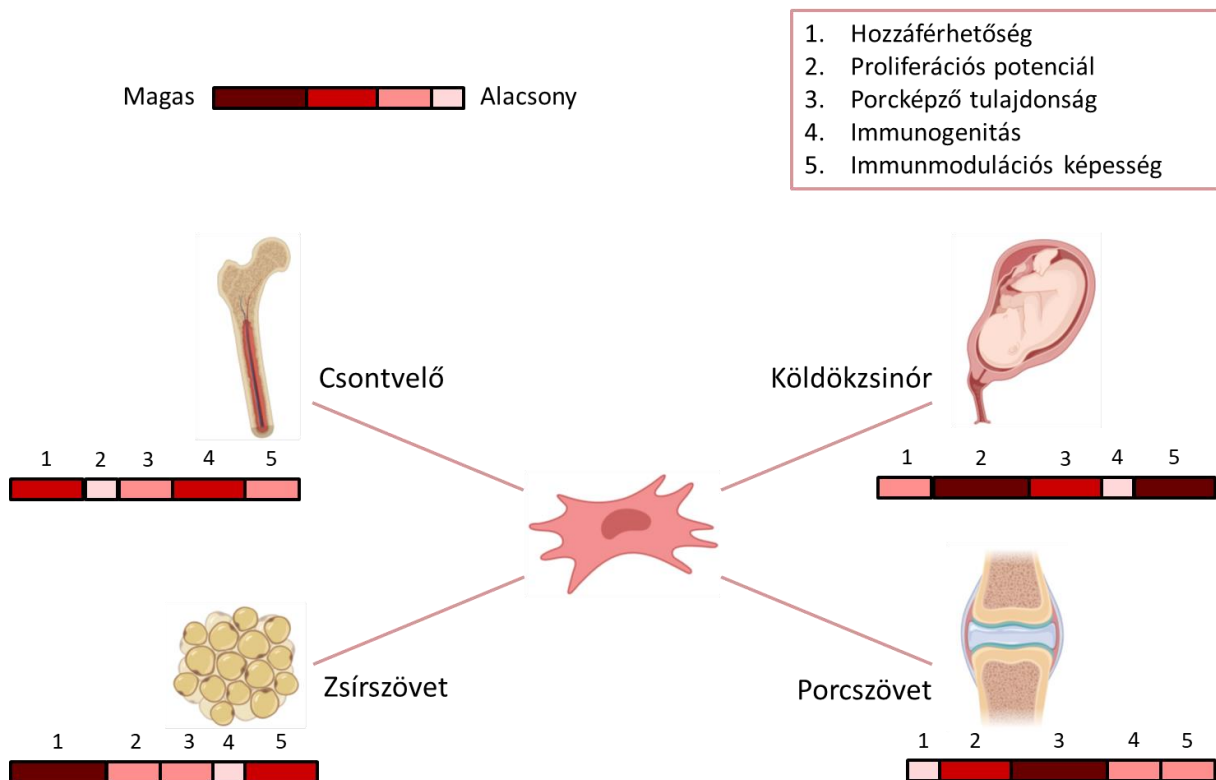
állapotot. (LPS- lipopoliszacharid, Poly(I:C)- Polyinosinic:polycytidylic acid, TLR- toll-like receptor)(11-15)

Ilyen anyagok például a bakteriális fertőzést imitáló lipopoliszacharid (LPS) és a vírusfertőzést utánzó poly(-I:C) (*Poly(I:C)- Polyinosinic:polycytidylic acid*) (11). Az LPS, a Gram-negatív baktériumok sejtfalában található komponens, melynek felismerése bakteriális fertőzés esetén kulcsfontosságú lépés a veleszületett immunrendszer beindítása során. Az LPS a TLR4 (*TLR- toll-like receptor*) liganduma, mely felismerés aktiváló hatását jól mutatja a különböző citokinek és kemokinek megemelkedett szintje (IL-1 β , IL-6, TNF α , CXCL1, IL-10) (11).

A TLR3 egy duplaszálú RNS-t érzékelő receptor. Aktiválásakor olyan jelátviteli útvonal indul el, aminek következtében gyulladásokeltető citokinek, többek között egyes típusú interferonok is termelődnek, melyek amellet, hogy a veleszületett immunitás számára nélkülözhetetlenek, szükségesek az adaptív immunrendszer vírus- és tumorelles működésében is (13). Épp ezért válnak egyre népszerűbbé a szintetikus, duplaszálú RNS-t utánzó TLR3 agonisták, köztük a poly(I:C). A poly(I:C) a TLR3 liganduma, ami duplaszálú vírusfertőzést indukál, ezzel olyan jelátviteli kaszkádot indít el, melynek eredményeképp aktiválódik az NF- κ B (*NF- κ B- Nukleáris faktor- κ B*) transzkripciós faktor és olyan proinflammatorikus citokinek átíródása aktiválódik, mint az IL-1, IL-6, TNF α , illetve I-es és II-es típusú interferonok (11). Ennek megfelelően, amennyiben naív dendritikus sejteket poly(I:C)-vel kezelünk, azzal aktiváljuk őket TLR3 receptoraikon keresztül. Ezt bizonyítja a fagocita képességük csökkenése, olyan kostimuláló molekulák, mint a CD80 és CD86 kifejeződése, illetve immunválaszt fokozó citokinek, többek között IL-12 termelése (13).

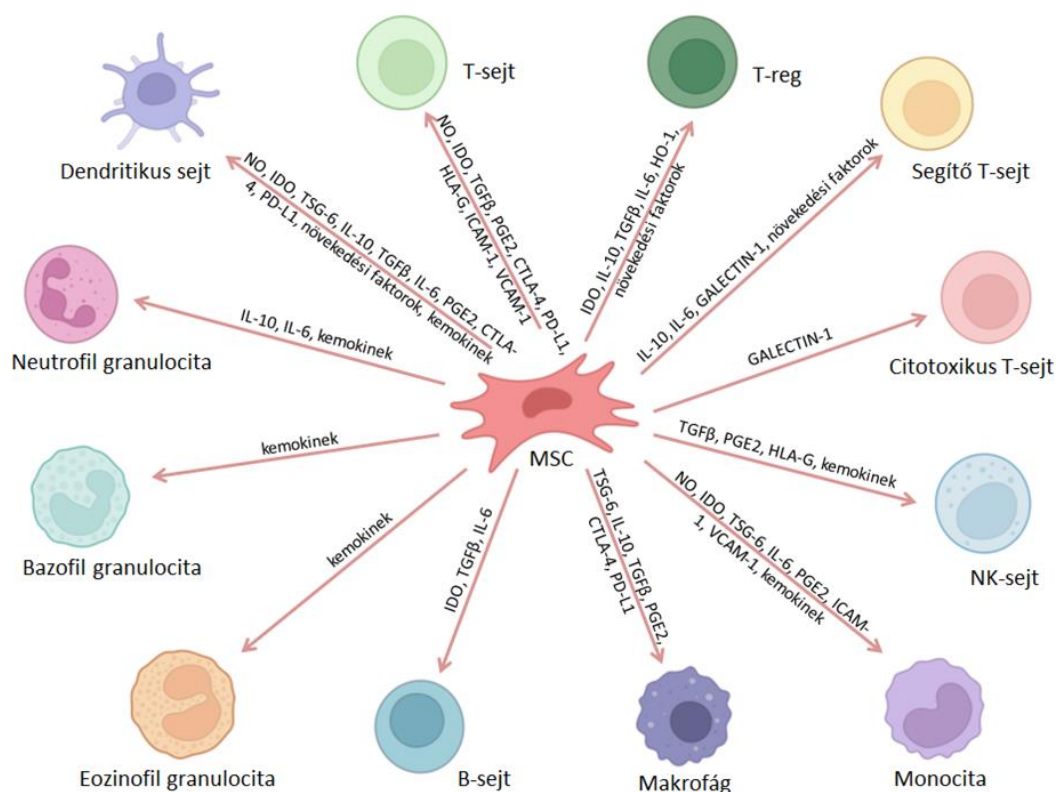
3.3 Mezenchymális őssejtek

Az őssejtek nagy differenciációs potenciállal jellemezhető sejtek, melyek fontos szerepet játszanak mind a magzati, mind a felnőtt szervezetben. Képesek önmegújulásra, illetve sérült vagy elhalt szövetek pótlására, így rendkívül fontosak a szervezetben zajló regenerációs folyamatok és a homeosztázis fenntartása során (16). Közülük egyre nagyobb figyelmet kapnak a mezenchymális őssejtek, melyek szinte bármely szövetből izolálható multipotens őssejtek, de fő forrásai a köldökszínór, zsírszövet és a csontvelő (16). Igazolt, hogy a szöveti lokalizáció függvényében az MSC-ek (*MSC- mezenchymális őssejt*) más-más terápiás hatással jellemezhetőek (17).



1. ábra **Különböző szövetekből izolált MSC-ek eltérőek tulajdonságaikban.** Az ábra a csontvelőből, zsírszövetből, köldökszínórból, illetve porcszövetből izolált MSC-eket hasonlítja össze hozzáférhetőség, proliferációs potenciál, porcképző tulajdonság, immunogenitás, valamint immunmodulációs képesség tekintetében.

Az ISCT által meghatározott kritériumrendszernek megfelelően felszínükön kifejezik a CD73, CD90, CD105 molekulákat, de nem expresszálnak hematopoetikus eredettel rendelkező sejtekre jellemző markereket, mint például CD34, CD14, CD19, valamint MHCII molekulákat (17). Immunmoduláló aktivitással rendelkező, fibroblaszt-szerű morfológiát mutató sejtek, melyek alacsony MHC expressziójuk miatt hipoimmunogén tulajdonságúak, terápiás potenciállal bírnak(17). Utóbbit direkt sejt-sejt interakciók, vagy az általuk termelt faktorok révén is kifejezhetik (18).



2. ábra Az MSC-ek számos szolubilis faktor és sejtfelszínen expresszált marker által képesek hatni mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszer sejtjeire. Az ábra az MSC-ek által termelt immunmoduláló anyagokat és ezek célsejtjeit szemlélteti. (Ábra elkészítéséhez felhasznált irodalom: PhD disszertáció, Türk-Mázló Anett, 2021)

Immunrendszerünkben az alul- és túlműködés is kóros állapotokhoz vezethet, így az immunválasz szabályozása kritikus. Az MSC-ek rendelkeznek mind gyulladást elősegítő proinflammatorikus, mind a gyulladást gátló antiinflammatorikus tulajdonsággal (18). Immunmoduláló képességüket kifejthetik közvetlen sejtkontaktus révén is, viszont nagy jelentőséggel bírnak a szekretált faktorok által kifejtett hatások. Terápiás céllal főleg immunszuppresszív tulajdonságukat használják ki. Az egyik leghatékonyabb módja az immunválasz szabályozásának, ha az immunrendszer sejtjeit, például a dendritikus sejteket, makrofágokat, T-sejteket, NK-sejteket közvetlenül szabályozzák (18).

Az MSC-eken/-ben számos TLR receptor, köztük TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR9 található, ezek expressziós szintje a különböző szövetekben jelentősen eltérhet (18). Ezeket a receptorokat aktiválhatják a gyulladásos környezetben jelenlevő anyagok, amik hatására antiinflammatorikus faktorok szabadulnak fel, ezzel meghatározzák a gyulladásos folyamatok kimenetelét. Általuk expresszált immunmodulátorok többek között a PGE2 (PGE-

prostaglandin E), TGF- β (TGF- *Transforming growth factor*), IL-10, PD-L1 (PD-L- *Programozott sejthalál ligandum*), PD-L2, HLA-G (HLA- *Humán leukocita antigén*) (18).

3.2.1 Extracelluláris vezikulumok

Az exoszómák olyan vezikulumok, amik nem tartalmaznak sejtorganelumokat, viszont azonosítottak bennük az anyasejtből származó fehérjéket, lipideket és nukleinsavakat. Szinte minden sejt termel exoszómákat mind *in vitro*, mind *in vivo*, beleértve az idegsejteket, zsírszteket, őssejteket és tumoros sejteket is. Az MSC-eredetű exoszómák fontos szerepet játszanak a szöveti károsodás helyreállításában, mivel segítenek elnyomni a gyulladásos válaszokat, gátolják az apoptózist, illetve fokozzák az angiogenezist. Bizonyított az MSC-EV-ok (EV-extracelluláris vezikulum) terápiás hatékonysága szív- és érrendszeri megbetegedéseknél, vese-, máj és neurológiai megbetegedésekben (19). Feltárták, hogy a humán MSC-EV-ok közvetlen hatással vannak többek között a monocita eredetű dendritikus sejtekre azáltal, hogy leállítják érésüket, valamint csökkentik antigén felvevő képességüket. Az MSC-ekből származó vezikulumok csökkentették a DC-ek érési és aktivációs markereinek - mint például a CD80, CD83, CD38 - expresszióját, csökkentették az IL-6 és IL-12 felszabadulást, továbbá növelték a TGF- β termelést (19).

3.4 Mezenchymális őssejtek dendritikus sejtekre gyakorolt hatása

A mezenchymális őssejtekkel kapcsolatos kutatásokban egyre nagyobb figyelmet kapnak az immunsejtekre, ezen belül is a dendritikus sejtekre kifejtett hatásaiknak vizsgálata. Feltételezéseink szerint bizonyos esetekben a MSC-ek az immunrendszer koordinátoraként működnek, főként tolerogén hatást fejtenek ki. Ebben szerepe van a közvetlen sejtkontaktusnak, a citokinek és növekedési faktorok termelésének, valamint a membránreceptorok általi jelátvitelnek. Az immunrendszer sejtjeihez hasonlóan a mezenchymális őssejtek is citokinek komplex hálózatával képesek immunmoduláló funkcióikat kifejteni (18).

Ismert, hogy a mezenchymális őssejtek fiziológiás és patológiás körülmények között egyaránt kommunikálnak a mikrokörnyezettel, kapcsolatba lépnek mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer sejtjeivel. Immunmoduláló hatásuk nem konstitutív, nagyban függ az aktivált immunsejtek gyulladásos citokin szekréciójától, a jelenlevő DAMP-októl, illetve a gyulladás feloldásában szerepet játszó SPM-ektől (SPM- *speciális pro-rezolváló mediátor*) (18). Számos eddigi tanulmány foglalkozott vele és bizonyította be, hogy az MSC-ek több szinten hatást gyakorolnak a dendritikus sejtekre. A mezenchymális őssejtek képesek

megváltoztatni a DC-ek fenotípusát, érését, differenciálódását, citokintermelését, illetve antigén prezentáló tulajdonságaikat is csökkentik (20).

Egy tanulmányban, ahol csontvelői MSC és monocita kokultúrát vizsgáltak GM-CSF (*Granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor*) és IL-4 jelenlétében, megfigyelték, hogy a monociták dendritikus sejtekké való differenciálódása olyan irányba változott, hogy azok nem expresszáltak CD1a-t, tehát nem differenciálódtak éretlen DC-vé, míg az MSC jelenléte a CD14 expressziót nem befolyásolta (21). Egy másik hasonló tanulmányban bizonyították, hogy MSC jelenléte lényegesen elnyomja az olyan kostimulációs molekulák kifejeződését, mint a CD40, CD80, CD86, illetve csökkenti a HLA-DR expressziót.

Érett DC-ek esetében gátolhatják a migrációt, illetve képesek őket az IL-10-SOCS3 útvonalon keresztül szuppresszív, éretlen fenotípusú sejtekké változtatni (18). Az MSC-ek által termelt TGF- β , PGE-2, IL-10 gátló hatást fejtenek ki a DC-ekre, illetve a DC-eket is gátló citokinek, mint például IL-10 termelésre ösztönzik.

3.5 HMGB1, resolvin-D1 szintézise, hatásai

In vivo az immunsejtek működésére különböző molekulák, köztük DAMP-ok, SAMP-ok (SAMP- a DAMP-ok szuppresszorai), PAMP-ok hatnak. A PAMP-ok és DAMP-ok veleszületett immunrendszer általi felismerése indítja be az immunválaszt. Kórokozó hiányában, steril gyulladások a haldokló sejtekből felszabaduló anyagok a sejthalál típusától és a felszabaduló anyagok természetétől függően különböző válaszokat indukálhatnak, valamint az aktivált immunsejtek is számos anyagot választanak ki, ezek összessége meghatározza a gyulladás mikrokörnyezetét (22). Ilyenek a károsodáshoz köthető DAMP-ok, például HMGB1 (*HMGB1- High Mobility Group Box 1*), ATP (*ATP- Adenozin-trifoszfát*), HSP-k (*HSP- hő sokkprotein*), szuppresszorai, valamint a resolvinok, maresinek, prosztaglandin E2, amelyek hozzájárulnak a gyulladást feloldó folyamatokhoz (23, 24).

A DAMP-ok jellemzően a haldokló sejtekből szabadulnak fel, de akár súlyos stressznek kitett élő sejtekből is származhatnak. Érzékelésüket követően az iniciátor immunsejtek aktiválódnak, melyek ezután további mediátorokat, köztük DAMP-okat és SPM-eket termelnek (24). Ez a környezet összességében hat a gyulladásban résztvevő, illetve az azt szabályozó sejtekre, köztük az MSC-ekre is.

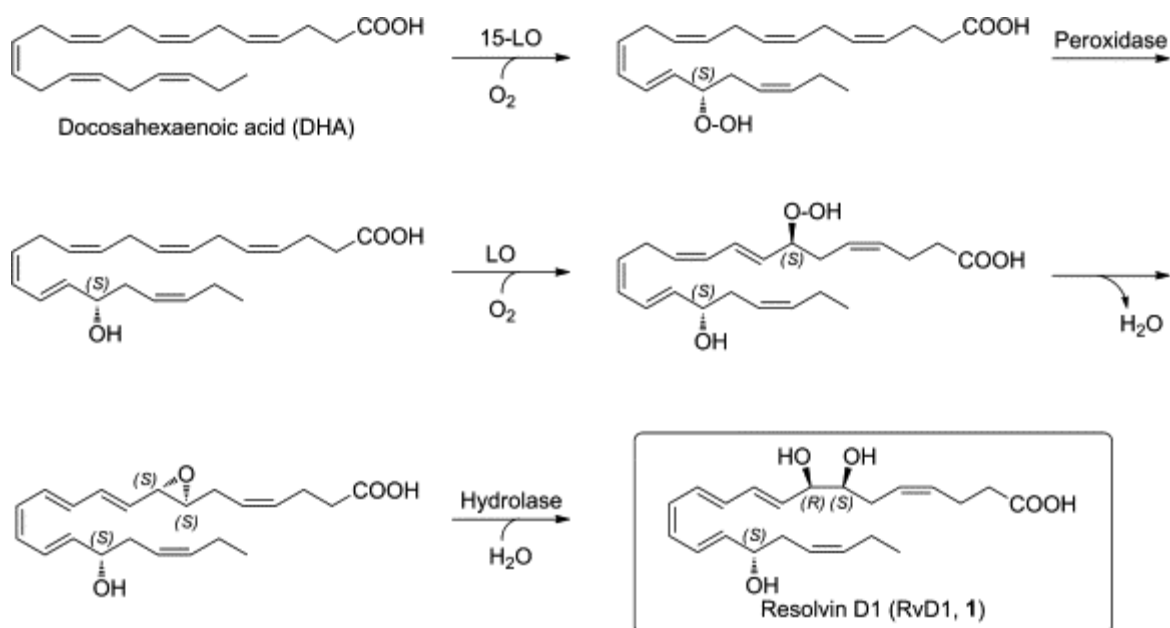
A HMGB1 az egyik legtöbbet tanulmányozott DAMP, melynek proinflammatorikus hatása mellett prorezolváló hatásáról is beszámoltak. Alapvetően egy nem-hiszon magfehérje, melynek extracelluláris jelenléte számos szabályozó hatást fejthet ki a sejtekre, magába foglalva az érést, proliferációt, aktiválódást, sejthalált, túlélést vagy gyulladást (23).

Extracelluláris jelenlétét szinte az összes sejthalál esetében azonosították, többek között apoptózisnál, nekroptózisnál, piroptózisnál és ferroptózisnál (24). Fő receptorai a TLR4 és a RAGE (23).

Gyulladásban betöltött proinflammatorikus szerepére számos bizonyíték van, a fertőzés korai stádiumában megjelenő hagyományos gyulladásos citokinek (TNF α , IL-1 β) után a későbbi szakaszban megjelenő HMGB1 súlyosbíthatja a gyulladást (23). Bizonyított, hogy makrofágokban és dendritikus sejtekben is közvetlenül kötődik a TLR4-hez és proinflammatorikus citokinek szekrécióját indukálja. Ezzel szemben prorezolváló hatásáról is beszámoltak. Például apoptózisnál a ROS (*ROS- reaktív oxigén gyök*) termelés a HMGB1 terminális oxidációját váltja ki, ami proinflammatorikus tulajdonságait gátolva a toleranciát segíti elő kaszpáz-1 függő módon. Vannak olyan gátló molekulák, melyek komplexet képezve a HMGB1-gyel megváltoztatják annak tulajdonságait, ilyenek a CD24, CD52, C1q. A CD52 a gyulladáskeltő tulajdonságát gyulladásgátlóvá alakítja úgy, hogy elősegíti kötődését a Siglec-10 gátló receptorhoz (22). A HMGB1-C1q komplex gátolja a proinflammatorikus citokinek expresszióját és serkenti az IL-10 gyulladáscsökkentő citokin termelődését, illetve a PD-L1 immuntoleranciát szabályozó molekula kifejeződését. Összefoglalva a HMGB1 immunmoduláló hatását befolyásolja a sejthalál típusa, a jelenlevő receptorok és a szöveti környezet.

Gyulladásnál a proinflammatorikus hatású anyagok mellett a gyulladás helyreállításában és csillapításában részt vevő vegyületek, köztük SPM-ek is felszabadulnak. Az SPM-ek olyan lipid mediátorok, melyek a gyulladásos reakciókban termelt kémiai anyagokra válaszul szintetizálódnak és fontos szerepük van a szöveti gyulladás feloldásában (25). Többek között gátolják a neutrofilek toborzását és aktivációját, stimulálják az NK-sejteket, hogy kiváltsák a neutrofilek apoptózisát, fokozzák a makrofágok funkcióit, elősegítik az efferocitózist, leállítják a gyulladásos citokinek termelését (25). A csoport magába foglalja a lipoxinokat, marezineket, protektineket és resolvinokat.

A resolvinok két nagy csoportja az E és D resolvinok. Az RvD (*RvD- resolvin-D*) a DHA (*DHA- Dokozaheksaénsav*) epoxidjából származik 15 LOX (*LOX- lipoxigenáz*) és 17-HDHA reakcióján keresztül, a konjugált kettős kötések és a hidroxil-csoportok száma szerint megkülönböztetünk RVD1-et, RVD2-t, RVD3-at, RVD4-et, RVD5-öt és RVD6-ot, közülük a legtöbbet tanulmányozott az RVD1 (26).



3. ábra A resolvin-D1 bioszintézise (Ábra forrása: Rodriguez A. R. et al, *Tetrahedron Letters*, 2012)

Az RVD1-et leukociták termelik és jelen van többek között a májban, nyirokcsomókban, lépben, vizeletben, fehér zsírszövetben. Gyulladásakor a többi SPM-hez hasonlóan gyulladásgátló szerepet játszik. Számos jelátviteli útvonalat magába foglal, beleértve az NF- κ b-t, CXCL-12/CXCR4-et, MAPK-t (MAPK - Mitogén aktivált protein kináz), valamint megakadályozza a TLR9 expressziót is. Gátolja az IL-1 β , IL-6, TNF- il inflammatorikus citokinek termelődését, elősegítve a gyulladás feloldását (26). Jótékony hatását kimutatták különböző gyulladásos betegségeknél, például rheumatoid arthritisnél, tüdőgyulladásnál, szepszis okozta szívkárosodásnál, agykárosodásnál.

4. Célkitűzés

Célunk a mezenchymális őssejtek immunmoduláló hatásának részletesebb feltárása, optimalizálása. Szeretnénk meghatározni, hogy a különböző gyulladás során jelenlevő faktorok hogyan hatnak az MSC-ekre, illetve az ilyen módon prekondicionált MSC-ek milyen hatással vannak az immunválasz során kulcsfontosságú dendritikus sejtekre. Az MSC-ek immunmodulációjának mélyebb megértésével az őssejt terápia hatékonyságát szeretnénk növelni.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Monocita szeparálás, dendritikus sejt differenciáltatás

Kísérleteinkhez egészséges humán donorokból származó trombocita-mentesített Buffy-coatokat használtunk, amit a Debreceni Regionális Vérellátó Központ bocsátott a rendelkezésünkre. A monocita szeparálás steril körülmények között történt, lamináris boxban. Ehhez a vért fiziológiás sóoldattal (*Salsol, Teva, Debrecen*) 1:1 arányban hígítottuk, majd Ficoll-Plaque oldatra (*GE Healthcare BioSciences AB, Uppsala, Sweden*) rétegeztük, centrifugáltuk (2500 rpm, 20 perc, lassú leállás), ezt követően a vér alakos elemei sűrűség grádiens alapján különböző rétegekben szétvááltak. A PBMC (*Peripheral Blood Mononuclear Cells*) gyűrű a legfelső folyékony plazma és az alatta lévő Ficoll réteg határán jelent meg, melyet összegyűjtöttünk. Ezt a heterogén sejtpopulációból álló gyűrűt új falkon csőbe tettük és MACS pufferben vettük fel (60g marha szérum albumin-BSA foszfát pufferelt sóoldatban-PBS: 160g NaCl, 4g KCl, 54g $N_2HPO_4 \cdot 12H_2O$, 4g KH_2PO_4 /20liter desztillált víz, pH 7,2), majd fugáltuk (1500rpm, 10 perc, 12°C), felvettük ismert mennyiségű MACS pufferben és Bürker kamra segítségével tripánkék festéssel (*Trypan Blue solution, SIGMA, Germany*) sejtszámolást végeztünk. A sejteket mágneses térben (*VarioMACS, Miltenyi Biotech, Germany*) LS oszlop (*Miltenyi Biotech, Germany*) segítségével szeparáltuk. A $CD14^+$ monociták pozitív szelekciója a heterogén sejtszuspenzióból (*Quadro MACS, Miltenyi Biotech*) anti-humán, paramágnesesen jelölt anti-CD14 monoklonális antitesttel történt (*Miltenyi Biotech, Germany*). 10^8 sejthez 20 μ l anti-CD14 gyönggyel konjugált ellenanyagot és 80 μ l MACS puffert adtunk, ezután a sejteket 20 percig jégen inkubáltuk, majd a sejtszuspenziót MACS pufferrel 45 ml-re kiegészítve 1500rpm-en 12°C-on centrifugáltuk. Centrifugálást követően a pelletet 500 μ l MACS pufferben vettük fel, majd egy előkészített, mágneses sejtszeparáló berendezésben levő (*VarioMacs*) oszlopra pipettáztuk. A $CD14^+$ monociták kitapadnak az oszlophoz (pozitív szelekció) míg az egyéb sejtek átfolynak rajta. A pellet pipettázása után, az oszlopot először 3x1 ml, majd 2x3 ml MACS pufferrel mostuk majd az oszlopot eltávolítottuk a mágneses térből és 6 ml MACS pufferrel a $CD14^+$ monocitákat átmostuk egy 15 ml-es centrifugacsőbe. Újabb sejtszámolást végeztünk, majd a sejteket 5×10^6 monocita/ml sejtszámban 48 lyukú platen 0,5 ml 10% FCS (*Gibco, Paisley, Scotland*), 1% Penicillin-Streptomycin (*Hyclone, South Logan, Utah*) tartalmú RPMI-1640 (*Sigma Aldrich, Missouri, U.S.*) médiumban vettük fel.

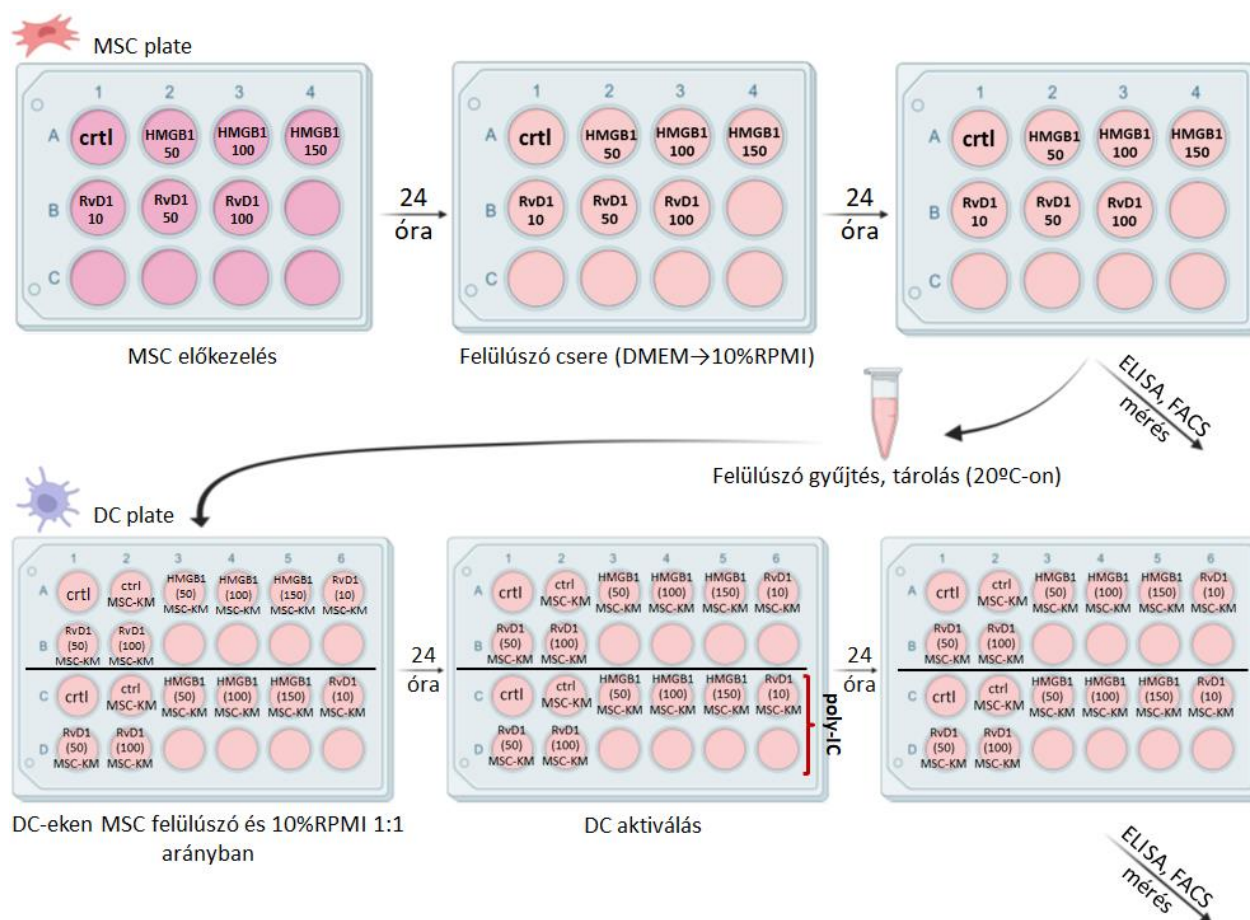
A monocitákból 100 ng/ml humán IL-4 (*Peprotech EC, UK*) és 80 ng/ml GM-CSF (*Leucomax; Gentaur Molecular Products, Belgium*) citokinek jelenlétében a 3. napra nyugvó DC-ek differenciálódtak.

5.2 Mezencymális sztróma szerű sejtek és csontvelői őssejtek tenyésztése

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 sejtvonalat T75 flakában (*TPP, Trasadingen, Switzerland*) tartottuk fenn. Kétnaponta ellenőriztük a sejtenyészetet fénymikroszkóppal. Abban az esetben, ha 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 MSCi sejteket maximum 14 passzálás számig használtuk fel kísérleteink során.

A csontvelői őssejteket (BM-MSC-eket) (*US, PoieticsTM*) 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, 37°C-on, 5% CO₂-t tartalmazó párasított légterű termosztátban tenyésztettük. A sejtvonalat T75 flakában (*TPP, Trasadingen, Switzerland*) tartottuk fenn, 3-4 naponta etettük. A konfluenciát fénymikroszkóppal ellenőriztük. Abban az esetben, ha a tenyészet elérte a 80-90%-os konfluenciát, a sejtek érintkeztek egymással vagy nagyobb csoportokba rendeződtek, az optimális növekedés fenntartása érdekében passzálást végeztünk 0.02-0.05% TE-EDTA (*Hyclone, South Logan, Utah*) használatával.

5.3 Kísérleti rendszer bemutatása



4. ábra Kísérleti rendszerünk bemutatása. Kísérleteink során a primer csontvelői MSC-ekkel és az MSC sejtvonallal ugyanúgy jártunk el. Miután az MSC-ek kellőképpen benőtték a plate-et, HMGB1-gyel és resolvin-D1-gyel kezeltük őket, illetve volt egy kontroll csoport (ctrl), amelyik nem kapott kezelést. (Koncentrációk: HMGB1: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, resolvin-D1 koncentrációk: 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml). 24 órás inkubálást követően mostuk a lyukakat, valamint a médiumot DMEM-ről 10% RPMI-re cseréltük. Újabb 24 óra elteltével a sejtekről steril Eppendorf csövekbe gyűjtöttük a kondicionált médium egy részét, amivel később a dendritikus sejteket (DC) kezeltük, egy másik részét pedig ELISA-hoz raktuk el, majd -20 °C-on tároltuk őket. AZ MSC-eken expresszálandó sejtfelszíni markereket FACS (fluorescence activated cell sorting) módszerrel vizsgáltuk. Mikor a DC-ek is megfelelőek voltak, a rajtuk levő médium (10% RPMI) mellé 1:1 arányban hozzájuk adtuk a kondicionált MSC médiumot (MSC-KM) az ábrán feltüntetett módon. A „ctrl” elnevezésű lyuk nem kapott MSC-KM-ot. Miután ebben a közegben inkubálódtak 24 órát, a plate egyik felét poly(I:C)-vel aktiváltuk. (Koncentráció: 25 mg/ml). 24 óra elteltével a felülűzőkat az MSC-ekhez

hasonlóan összegyűjtöttük ELISA-hoz, a sejteken expresszáldó markereket pedig FACS módszerrel vizsgáltuk.

5.4 Enzim kötött immunszorbens esszé (ELISA)

A sejtek által termelt citokinek és kemokinek mennyiségét meghatározhatjuk egy standard sorhoz viszonyítva. Kísérleteink során a DC-ek által szekretált IL-10, IP-10, és az MSC-ek által szekretált IL-6, IL-8 tartalmát vizsgáltuk OptEIA kit-ek felhasználásával (BD Biosciences). A lépések közt a cég előírásainak megfelelően mostuk a lemez lyukait. Coating pufferben (0,1 M Sodium Carbonate, pH 9,5; 7,13 g NaHCO₃, 1,59 g Na₂CO₃; q.s.1.0 L; pH 9,5 10 N NaOH-dal) hígított (250×) primer ellenanyagot (Capture Antibody) pipettáztunk a 96 lyukú BD Falcon™ ELISA lemez lyukaiba, majd a lemezt egy éjszakán át 4 °C-on inkubáltuk. A következő napon a plate lyukait PBS-TWEEN-nel (MilliQ + 10% PBS+ 0,05% TWEEN-20) mostuk, ezt követően 10% FCS tartalmú PBS-sel fedtük a lemez lyukait, majd a lefedett lemezt 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk az aspecifikus kötődések kivédése érdekében. Ezalatt elkészítettük a standardek (rekombináns humán IL-6, IL-8, IL-10, IP-10) megfelelő hígításait, mely során mindig a cég által előírt instrukciókat követtük. A hígításhoz PBS+10% FCS-t használtunk. Az inkubációs idő leteltével 5-ször mostuk a plate lyukait, majd felvittük megfelelő hígításban (két párhuzamos sorban felező hígításokat készítettünk, az oszlopok utolsó lyukainak kihagyásával) a standard sort (50 µl/lyuk), ezt követően pedig a mintákat is (50 µl/lyuk). A minták felvitelét követően 2 órás inkubáció következett, ezután a lyukakba pipettáztuk a Sav-HRP (*Streptavidin horseradish peroxidase konjugátum* - Sav-HRP) enzimet, valamint a másodlagos antitestet (*Detection Antibody Biotin Anti Human IL-6/IL-8/IL-10/IP-10*) 250×-es hígításban (100 µl/lyuk). Az 1 órás inkubációs idő elteltével mostuk 7-szer a lyukakat, majd citrát, TMB (*Tetramethylbenzidin és /hidrogén-peroxid/- BD Pharmingen™ TMB Substrate Reagent Set*) és 2µl H₂O₂ felhasználásával elkészítettük a fényérzékeny szubsztrát oldatot, amit aztán a lemez lyukaiba mértünk (50µl/lyuk). A reakciót a színreakció megjelenését követően 2N H₂SO₄ hozzáadásával a különböző citokinek/kemokin esetében eltérő időpontokban állítottuk le, 2-10 perccel a szubsztrát hozzáadását követően. A kiértékelés során a vak (10% FCS tartalmú sterilen szűrt PBS) OD (optikai denzitás) értékeit kivontuk a minták és sztenderdek OD értékeiből, majd a standard sor felező hígítási sorára egyenest illesztettünk. Ezt követően az egyenes egyenletéből számítottuk ki a minták koncentrációját. A minták vizsgált citokin/kemokin koncentrációjával arányos abszorbananciát ELISA reader segítségével, 450 nm hullámhosszon detektáltuk (*Bio-Tek Synergy HT Multi Detection Microplate Reader, KC4 v.3.4 Software*). A kapott értékek és

a standard sor koncentrációinak ismeretében, Excel program segítségével számoltuk ki a mintákban található citokinek, illetve kemokin koncentrációját.

5.5 A sejtek immunfluoreszcenciás jelölése áramlási citometriás vizsgálatához

Az MSC-eket és az MSC-ekről származó felülúszó jelenlétében differenciáltatott dendritikus sejteket összegyűjtöttük külön FACS csövekbe és hideg FACS pufferrel (0,5% BSA; 0,05% nátrium-azid PBS-ben) kétszer átmostuk (centrifugálás: 3000rpm, 1 perc). A sejtekről minden mosás után leöntöttük a puffert, majd a pelletet 100 µl FACS-pufferben vettük fel. Végül hozzáadtuk az ellenanyagokat 40 µl FACS-puffert tartalmazó csövekhez, melyeket a cég által megadott mennyiségben alkalmaztunk. A sejteket ezután 30 percig jégen, sötétben inkubáltuk. A nem kötődött ellenanyagok eltávolítására a sejteket újból átmostuk hideg FACS pufferrel (centrifugálás: 3000rpm, 1 perc), majd a jelölést 4%-os paraformaldehid oldattal (*Paraformaldehid*) / (CH_2O) x / PBS-ben oldva) (*Riedel-de Haen, New Jersey, USA*) fixáltuk. A fluoreszcencia intenzitás detektálásához BD FACS Calibur áramlási citométert (*BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA*) használtunk. A festékek gerjesztését argon-ion lézerrel végeztük, mely több hullámhossz kibocsátására képes 457–528 nm tartományban. Az emissziót az FL-1 (FITC), FL-2 (PE) valamint FL-3 (APC) csatornákon mértük. Ábráinkon az adott kezelések hatásának érzékletesebb prezentálása érdekében azon molekulák esetében, ahol a sejt kifejez egy molekulát, de annak mennyiségi megjelenése az adott kezelés hatására fokozódhat vagy csökkenhet, median fluoreszcencia intenzitást (MFI) ábrázoltunk. A pozitív sejtek százalékát mutattuk meg, amikor a sejtek, melyek expresszáltak, vagy melyek nem expresszáltak egy adott molekulát jól elkülöníthető populációkat alkottak. Az eredmények kiértékelése a FlowJo Version 10.1 (*De Novo Software, Los Angeles, CA*) programmal történt.

Fehérje	Festék	Katalógus szám
CD83	FITC	305306
CD86	PE	374206
PD-L1	PE	329706
PD-L2	APC	329608
CD1a	APC	300110
CD14	FITC	301804
CD90	FITC	328107
CD49b	APC	359309

CD105	FITC	323203
CD73	PE	344003
HLA-G	APC	335910
CD34	APC	251686

3. táblázat Az áramlási citometriás mérések során vizsgált sejtfelszíni molekulák jelölésére használt fluoreszcens festékekkel konjugált antitestek adatai.

	Gerjesztés (nm)	Emisszió (nm)
Fluorescein isothiocyanate (FITC)	488	525
Phycoerythrin (PE)	488	575
allophycocyanin (APC)	630	650

4. táblázat A fehérjék jelölésére használt festékek spektrális tulajdonságai

5.6 Statisztikai analízis

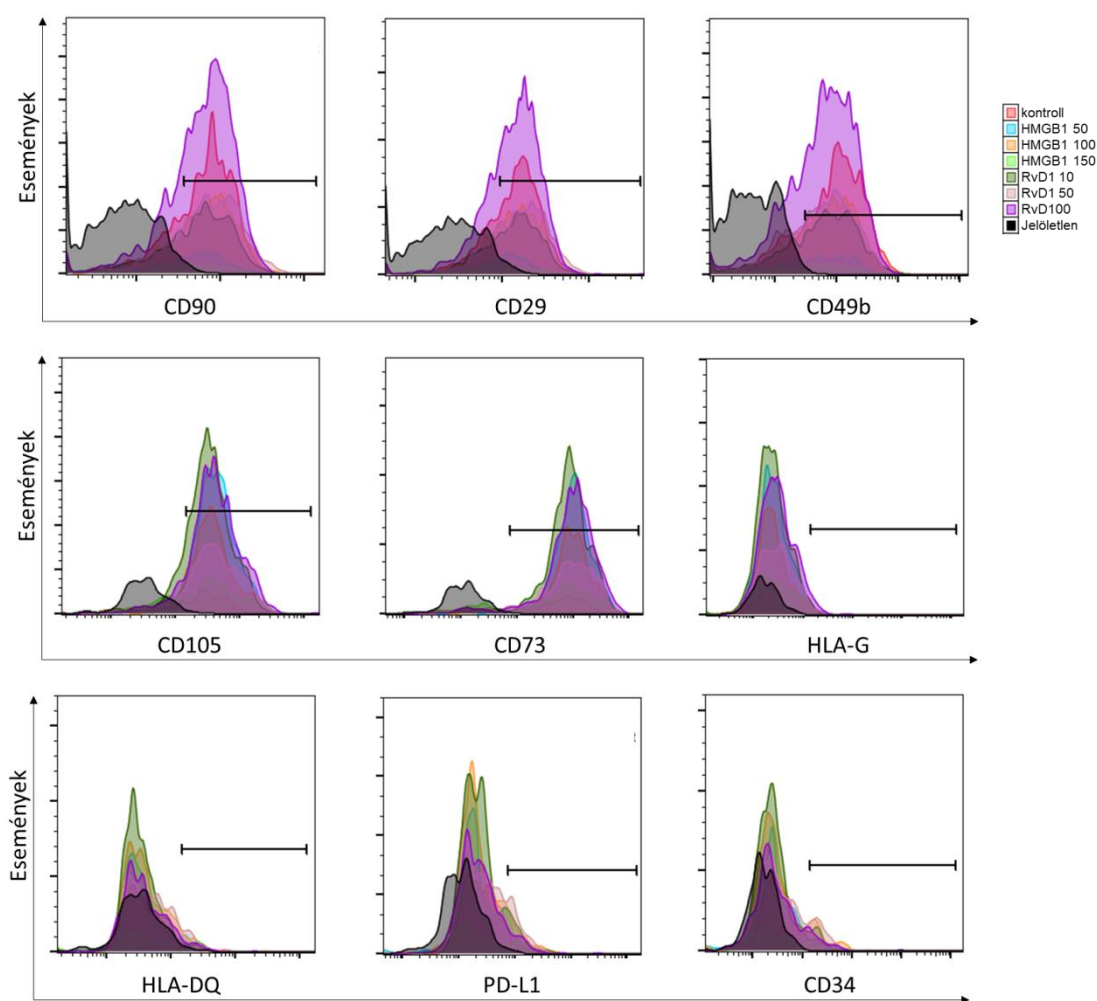
Ahol a donorszám lehetővé tette, ott egy utas ANOVA statisztikai próbát végeztünk ($n \geq 3$), melyet Bonferroni post hoc teszt követett. Statisztikailag szignifikánsnak tekintettük a különbséget, amennyiben $p < 0.05$ (p^*).

6. Eredmények

6.1 Különböző módokon prekondicionált MSC-ek sejtfelszíni markereinek vizsgálata

Mivel gyulladásos mikrokörnyezetben a gyulladást elősegítő proinflammatorikus, illetve a „feloldásban” résztvevő faktorok nagyban befolyásolják az MSC-ek effektor funkcióit, így fontosnak tartottuk elsősorban, hogy különböző prekondicionáló szerek hatását detektáljuk az MSC-ek fenotípusára. Kísérleteink kezdeti szakaszában több sejtfelszíni marker változását is vizsgáltuk, hogy ezek alapján kiválasszuk, mely markerek vizsgálatával érdemes a jövőben részletesebben foglalkoznunk. Áramlási citometria segítségével a következő markerek expressziójának változásait néztük: CD90, CD29, CD49b, CD105, CD73, HLA-G, HLA-DQ, PD-L1, CD34.

Mivel több kutatás is bizonyította, hogy a különböző szövetekből származó MSC-ek eltérő tulajdonságokkal jellemezhetőek, így vizsgálatainkat primer csontvelői MSC-eken, valamint MSCl sejtvonalon is elvégeztük és végig nagy hangsúlyt fektettünk a felmerülő különbségek detektálására.

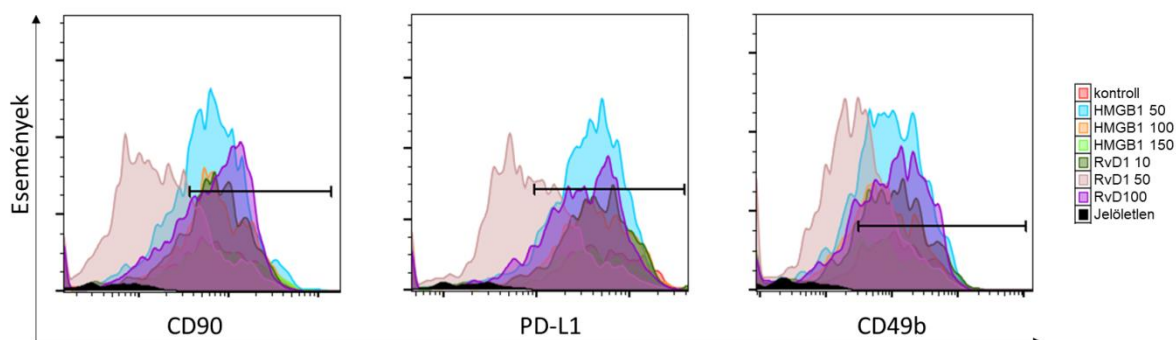


5. ábra Különböző módon prekondicionált BM-MSC-ek sejtfelszíni markereinek változásai.

Az ábrán feltüntetett markerek expressziós szintjének változását áramlási citometria segítségével vizsgáltuk. Az MSC-eket HMGB1 és resolvin-D1 különböző koncentrációival kezeltük, illetve volt egy kontroll csoport, ami nem kapott kezelést. 24 óra elteltével mostuk a lyukakat, valamint felülcszt cseréltünk DMEM-ről 10% RPMI-re, majd a FACS mérés ezt követően újabb 24 órával történt. A jelöletlen csoport azokat a sejteket mutatja, melyek a jelölés során nem kaptak antitestet. HMGB1 koncentrációk: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, resolvin-D1 koncentrációk: 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml. Az adatok kiértékelését FlowJo programmal végeztük.

Az eredményekből láthatjuk, hogy a különböző előkezelések leglátványosabb módon a CD90, CD29, valamint a CD49b expressziós szintjében okoztak különbségeket. A jövőben ezeknek a markereknek a részletesebb megfigyelését tűztük ki célul a primer csontvelői MSC-ek esetében.

Ugyanezeket a markereket vizsgáltuk MSC1 sejtvonalon is, az 5. ábra mutatja azokat a fehérjéket, ahol változásokat tapasztaltunk.



6. ábra *Sejtfelszíni markerek expressziós szintjének változása különböző módon prekondicionált MSC1 sejtvonal esetében.* Az ábra azokat a sejtfelszíni markereket mutatja, melyek esetében vizsgálatunk során figyelemreméltó változást tapasztaltunk a különböző kondíciókban. Az MSC1 sejtvonalat a BM-MSC-ekkel megegyező módon kezeltük.

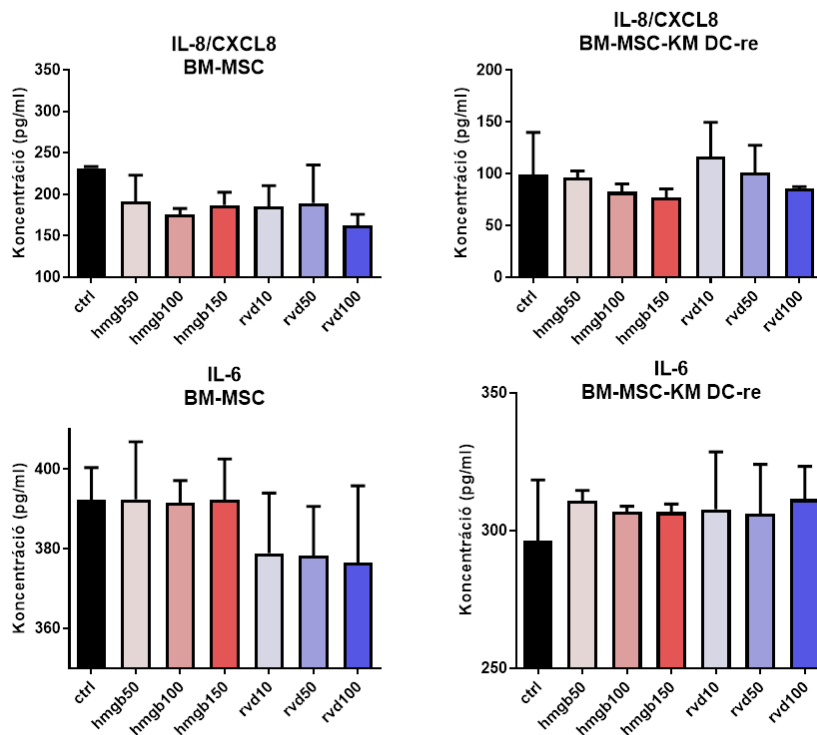
Különbséget találtunk a PD-L1 expressziójában az MSC1 és BM-MSC-ek között, ami a kísérletek számának ismételését és részletesebb feltárását kívánja a jövőben.

Elmondható, hogy kezeléseink hatására különböző mértékben változott a mezenchymális őssejtek fenotípusa.

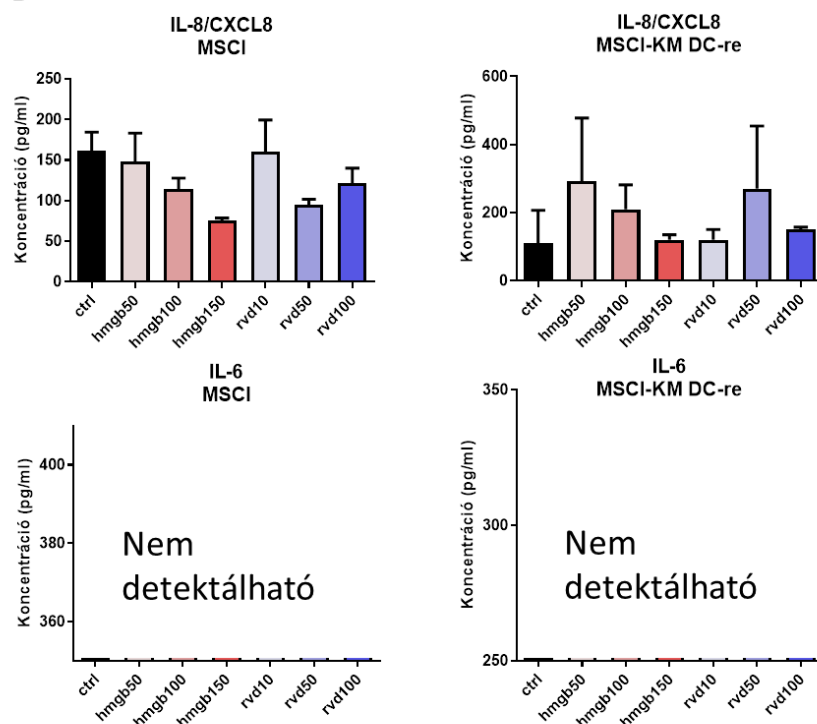
6.2 Prekondicionált MSC-ek citokintermelésének vizsgálata

Az MSC-ek gyulladásban betöltött effektor funkcióinak egyik kulcsfontosságú lépése a különböző citokinek termelése, mellyel hozzájárulhatnak a gyulladás megszüntetéséhez. Citokintermelésükre a szöveti környezetben megjelenő gyulladás-asszociált anyagok hatással lehetnek. További kísérleteinkben a prekondicionált MSC-ek által termelt citokinek mennyiségi vizsgálatára tértünk ki, figyelembe véve a BM-MSC-ek és MSC1 citokin termelésében fellépő esetleges különbségeket. Az MSC1 és BM-MSC-ek felülúszójának esetében is az IL-6 és az IL-8 citokinek mennyiségének detektálását végeztük ELISA módszer segítségével. E tekintetben vizsgáltuk azt a felúszót, amit a 24 órás kezelés után gyűjtöttünk és még tartalmazta a hozzáadott HMGB1-et és RvD1-et, illetve a már mosott sejtek által termelt felülúszóban található mennyiséget is, amivel majd később a DC-eket kezeltük. Eredményeink azt mutatják, hogy az MSC1 és BM-MSC-ek esetében különbözően hatnak az előkezelések a vizsgált citokinek termelésére.

A



B



7. ábra Prekondicionált MSCs és BM-MSCs citokintermelése. Az ábra a különböző koncentrációjú HMGB1-gyel és RvD1-gyel kezelt MSC-ek IL-6 és IL-8 termelését mutatja. Mindegyik esetben vizsgáltuk a citokin mennyiségét az előkezelés után 24 órával (ez még tartalmazza a hozzáadott HMGB1-et és RvD1-et), illetve a már mosott és médium cserén

átesett sejtek (DMEM-ről 10% RPMI-re) felülszójában jelenlevő citokinek mennyiségét is, mely felülszókkal a későbbiekben a DC-eket kezeltük. A sejtek által termelt citokinek mennyiségi vizsgálatát ELISA módszer segítségével határoztuk meg. Az ábra A részén primer csontvelői MSC-ek citokintermelése látható, a B részén pedig az MSC1 sejtvonal által termelt. HMGB1 koncentrációk: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, resolvin-D1 koncentrációk: 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml. ($n \geq 2$)

A BM-MSC-ek esetében az A ábrán az IL-8-nál láthatjuk, hogy miután lemostuk a sejtekről a HMGB1-et és RvD1-et, csökkent a termelt IL-8 mennyisége. A kontrollhoz képest az IL-8 termelést az előkezeléseink csökkentették 24 órát követően, majd a már mosott sejtek 24 órás felülszójának mérésénél ezek a különbségek gyengültek, illetve itt koncentrációfüggést is tapasztaltunk. IL-6 esetében az első 24 órás felülszóban a HMGB1-gyel és RvD1-gyel kezelt BM-MSC-ek esetében eltéréseket tapasztaltunk, a RvD1 csökkentette a termelt IL-6 mennyiséget, míg a HMGB1 nem okozott változást a kontrollhoz képest. A mosott sejtek 24 órás felülszójánál mindegyik előkezelés hatására növekedést láthatunk IL-6 tekintetében a kontrollhoz viszonyítva, a HMGB1 és RvD1 kezelés okozta különbségek itt kiegyenlítődték. Összességében viszont itt is elmondható, hogy mosás óra után kevesebb IL-6-ot mértünk a felülszóban.

Az MSC1 sejtvonalnál IL-8-at tekintve a kezelést követő 24 órás felülszóban a kontrollhoz képest csökkent citokintermelést láthatunk, míg mosást és felülszó cserét követően a második 24 órás felülszóban mindegyik kondíciónál nőtt a termelt IL-8 kontrollhoz viszonyított mennyisége. A BM-MSC-ekkel ellentétben itt mosás után nem csökkent, hanem nőtt a termelt citokinkoncentráció. HMGB1 kezelésnél az első és a második 24 órás inkubációt követően is koncentrációfüggést tapasztaltunk. IL-6 citokint nem detektáltunk MSC1 esetében.

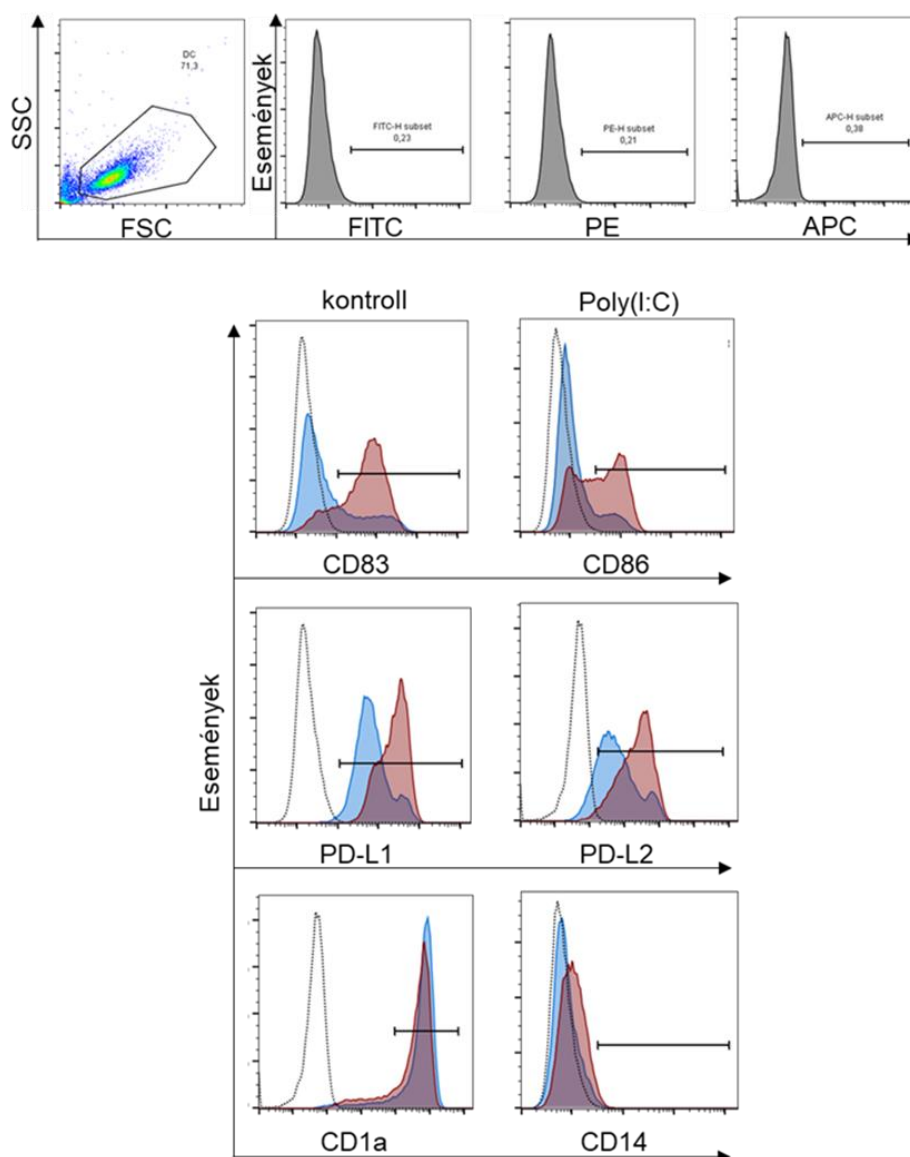
Megállapítható, hogy kezeléseink hatására különbségek látszanak a két MSC sejttípus citokintermelésében.

6.3 MSC-ekről származó kondicionált médium (MSC-KM) hatása moDC-ek fenotípusára

Több tanulmány is igazolta, hogy az MSC-ek több szinten képesek hatni a DC-ekre, beleértve a fenotípusuk megváltoztatását. Kísérleteinkben a kondicionált MSC1-ről és BM-MSC-ekről származó felülszó hatását szerettük volna feltárni dendritikus sejtek fenotípusára. Ezen túlmenően létrehoztunk a DC-ekből két csoportot: egy kontrollt, ami csak MSC-KM-ot

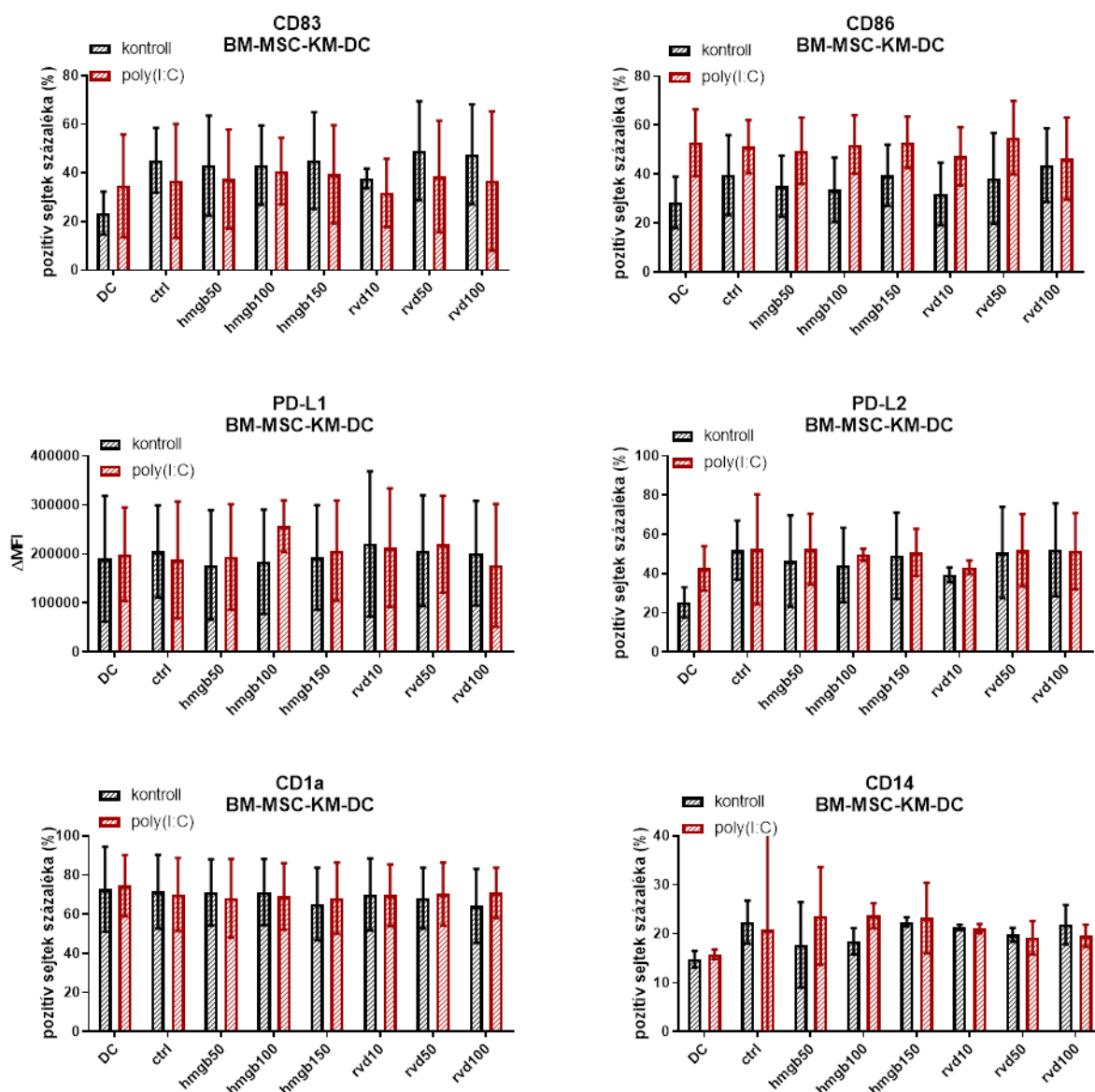
kapott, illetve egy olyat, ami szintén megkapta ugyanezt az MSC-KM-ot, de 24 óra után poly(I:C)-vel aktiváltuk. Így lehetőség nyílt az MSC-prekondicionálás antivirális válaszra gyakorolt hatásainak vizsgálatára. A két csoportot egymáshoz viszonyítva vizsgáltuk. A következő markerek expressziós szintjének változását figyeltük áramlási citometria segítségével: CD83, CD86, PD-L1, PD-L2, CD1a, CD14.

Kapuzási stratégia



8. ábra Kapuzási stratégia. Az áramlási citometriával történő méréseink kiértékelését a fenti kapuzási stratégia alapján végeztük el az MSC1 és BM-MSC-ekről származó kondicionált és kontroll moDC-ek esetében.

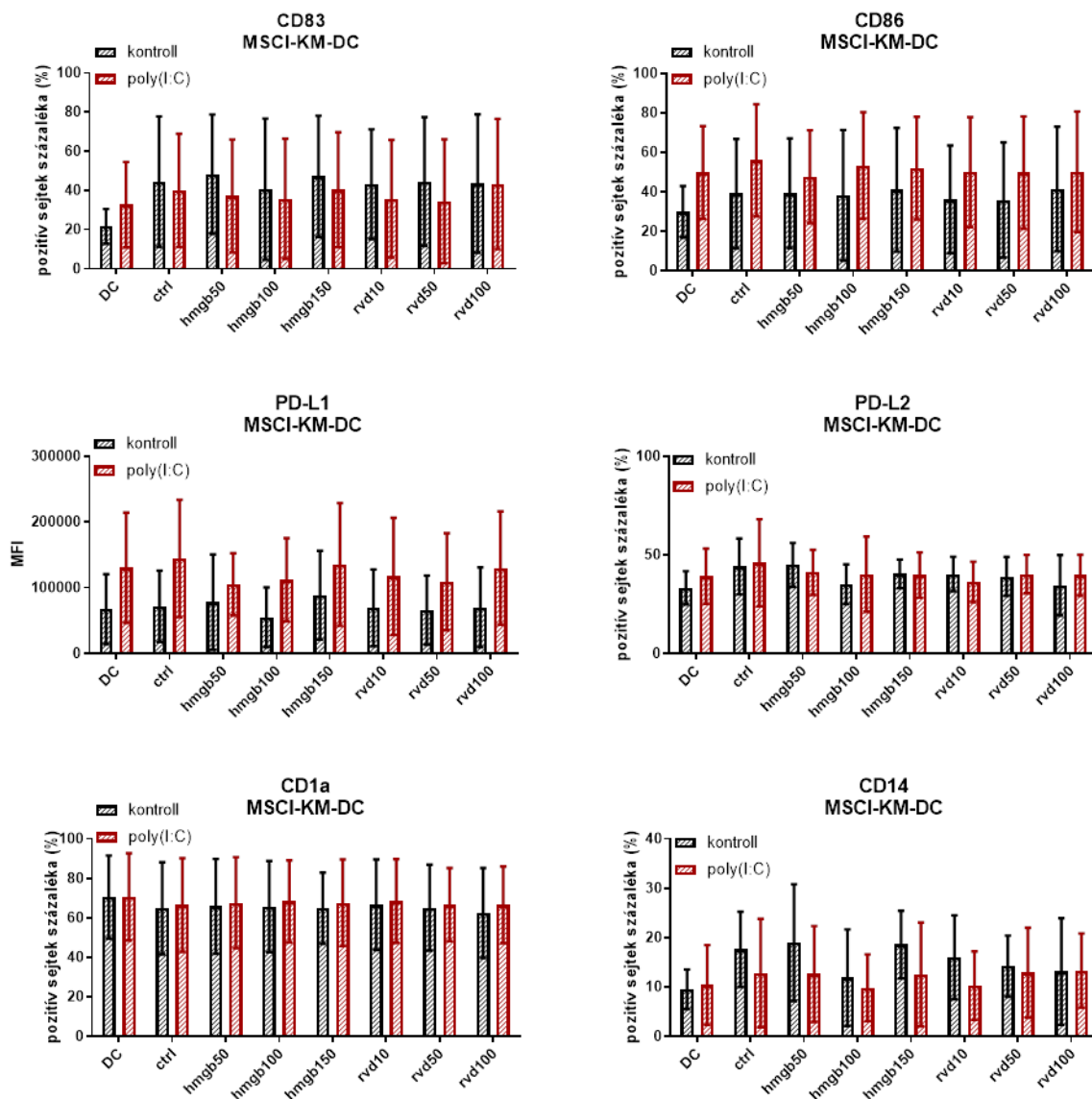
Több vizsgált marker kapcsán is változásokat találtunk.



9. ábra BM-MSK-KM hatása dendritikus sejtek fenotípusára. Az ábrán primer csontvelői MSC-ek kondicionált médiumával (BM-MSK-KM) kezelt dendritikus sejtek sejtfelszíni markereinek expressziós szintjében bekövetkező változásokat láthatunk, amit áramlási citometriával határoztunk meg. A poly(I:C) csoportot a felülíró megkapását követően 24 óra után aktiváltuk. A „DC” csoport nem kapott MSC-KM kezelést. A többi csoport neve azt jelzi, mivel kondicionáltuk a BM-MSK-eket. HMGB1 koncentrációk: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, resolvin-D1 koncentrációk: 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, poly(I:C) koncentráció: 25 mg/ml. Az adatok kiértékelését FlowJo programmal végeztük. ($n \geq 3$)

A CD83 expressziós szintjét a kondicionált médium úgy változtatta meg, hogy míg a felülúszót nem kapott DC-ek esetében az aktivált csoporton volt nagyobb a mennyisége, a BM-MSC-ek felülúszójának hatására minden esetben megnőtt a nem aktivált csoporton a marker kifejeződése. A CD86 aktivációs markert vizsgálva láthatjuk, hogy a poly(I:C)-vel történő aktiválásunk sikeres volt, illetve bizonyos kondíciók a kontroll csoportokon is növelték a marker mennyiségét. PD-L1-nél a 100 ng/ml koncentrációjú HMGB1-gyel kezelt BM-MSC felülúszó okozott nagyobb változást az aktivált csoportban. PD-L2 esetében a felülúszó jelenléte mind az aktivált, mind a nem aktivált csoportban növelte az expressziót, illetve a kontroll, felülúszót nem kapott DC csoportnál látott különbségeket több esetben kiegyenlítette. A CD1a-ra nem volt nagyobb hatással az MSC-KM. CD14-nél minden esetben nőtt a felülúszó hatására a marker expressziós szintje.

Ugyanezeket a markereket vizsgáltuk MSC1-KM esetében is, az eredményeket az 10. ábra foglalja össze.



10. ábra MSCI-KM hatása dendritikus sejtek fenotípusára. Az ábrán MSCI sejtvonal kondicionált médiumával (MSCI-KM) kezelt dendritikus sejtek sejtfelszíni markereinek expressziós szintjében bekövetkező változásokat láthatunk, amit áramlási citometriával határoztunk meg. A poly(I:C) csoportot a felülúszó megkapását követően 24 óra után aktiváltuk. A „DC” csoport nem kapott MSC-KM kezelést. A többi csoport neve azt jelzi, mivel kondicionáltuk az MSCI-eket. HMGB1 koncentrációk: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, resolvin-D1 koncentrációk: 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, poly(I:C) koncentráció: 25 mg/ml. Az adatok kiértékelését FlowJo programmal végeztük. ($n \geq 3$)

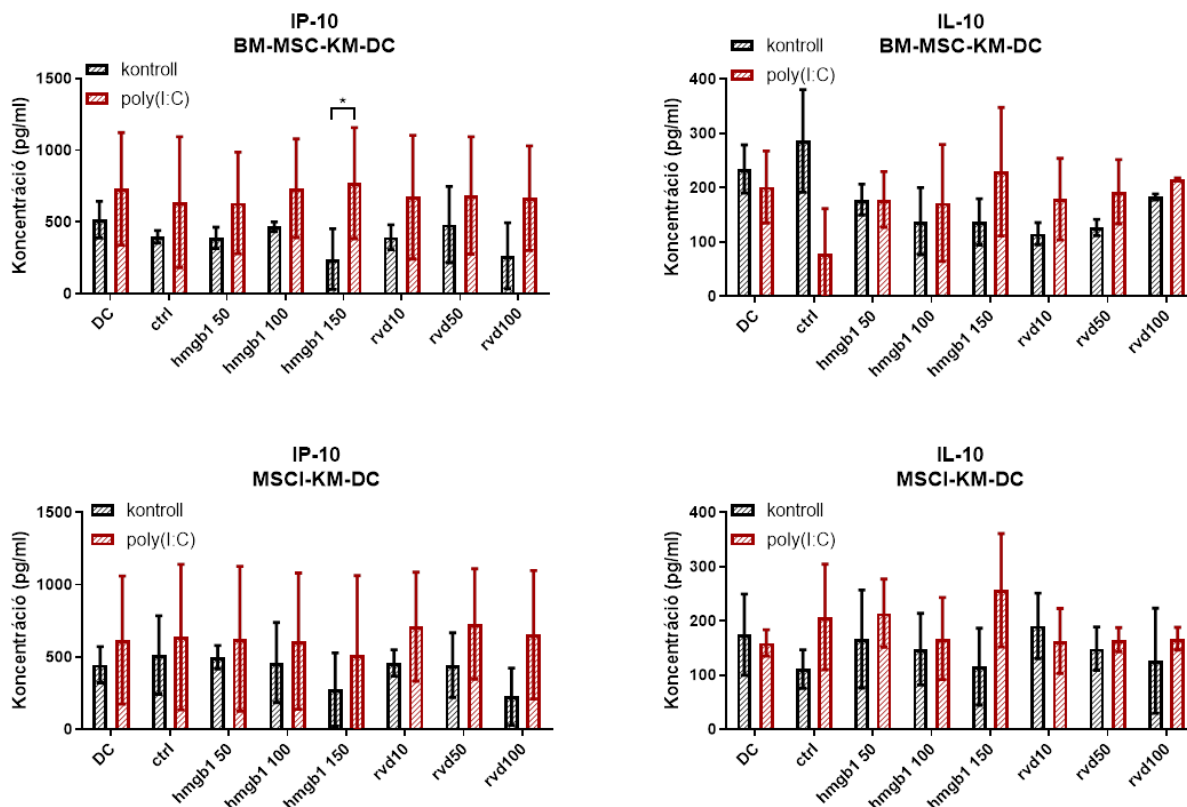
Ahogy azt láthatjuk, a CD83 expressziós szintje hasonlóan alakult, mint a BM-MSC-KM-mal kezelt sejteknél: a kontroll DC csoporthoz képest az MSCI felülúszó jelenléte

minden esetben megfordította az arányokat az aktivált és nem aktivált csoportok között, növelte a poly(I:C) kezelést nem kapott csoport aktiváltságát CD83 tekintetében. A poly(I:C) kezelés sikeres volt, ahogy ezt a CD86 kifejeződése mutatja. A PD-L1 expresszióját tekintve minden esetben tendenciális különbségek látszanak az aktivált és nem aktivált sejtek között, amit nem befolyásolt nagyobb mértékben az MSCl-KM jelenléte. Érdekes viszont, hogy a hasonló funkciójú PD-L2-nél nem ezt a mintázatot látjuk, ugyanis itt nem tapasztalunk a poly(I:C) kezelés hatására változásokat az expressziós szintben, illetve elmondható, hogy a MSCl felülűszó hatására nem történt nagyobb változás. A CD1a expressziója az összes vizsgált csoportban nagyjából azonos, függetlenül poly(I:C) aktiválástól és MSCl-KM-mal való kezeléstől. A CD14 kifejeződése úgy változott, hogy az MSC felülűszó jelenléte növelte a nem aktivált csoportban a mennyiségét a felülűszót nem kapott sejtekéhez képest, különösen a „ctrl”, „hmgb50” és „hmgb150” felülűszók esetében.

Eddigi eredményeink alapján látható, hogy az MSC felülűszók jelenléte hatással van a DC-ek fenotípusára és ez több esetben függ az MSC-ek előkezelésétől, de ennek pontos feltárása még a kísérletek számának ismétlését igényli.

6.4. MSC-KM hatása moDC-ek citokintermelésére

Végül vizsgáltuk az MSCl sejtvonal és BM-MSC-ek kondicionált médiumával kezelt DC-ek citokintermelését. Kísérleteink során az IL-10 és IP-10 citokinek DC médiumban jelenlevő koncentrációját határoztuk meg ELISA módszer segítségével.



11. ábra BM-MSK-KM és MSCI-KM hatása moDC-ek citokintermelésére. Az ábrán MSCI-sejtvonal (MSCI-KM) és primer csontvelői MSC-ek (BM-MSK-KM) kondicionált médiumával kezelt dendritikus sejtek által termelt citokinek mennyiségében bekövetkező változásokat látunk, amit ELISA módszerrel határoztunk meg. A poly(I:C) csoportot a felülúszó megkapását követően 24 óra után aktiváltuk. A „DC” csoport nem kapott MSC-KM kezelést. A többi csoport neve azt jelzi, mivel kondicionáltuk az MSC-eket. HMGB1 koncentrációk: 50 ng/ml, 100 ng/ml, 150 ng/ml, resolvin-D1 koncentrációk: 10 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml, poly(I:C) koncentráció: 25 mg/ml. ($n \geq 2$)

IP-10 esetében mind a HMGB1, mind a RvD1 legmagasabb koncentrációjánál tendenciális csökkenést láthatunk a nem aktivált csoport citokintermelésében a felülúszót nem kapott csoporthoz képest a BM-MSK-KM és MSCI-KM hatására is. A BM-MSK-KM az IP-10-et a HMGB1 150 ng/ml koncentrációjánál szignifikánsan csökkentette. Az IL-10 termelésben az előkezelést nem kapott BM-MSK médium hatására („ctrl”) tendenciális különbséget tapasztaltunk, mivel míg a nem aktivált csoport IL-10 termelése megemelkedett, az aktivált csoporté lecsökkent. Épp az ellenkező hatást váltotta ki viszont a ctrl MSCI-KM, ugyanis itt az aktivált csoport IL-10 termelése csökkent és a nem aktiválté nőtt. A HMGB1

kezelés leglátványosabban BM-MSK-KM és MSC1-KM kezelésnél is a 150 ng/ml koncentrációjú csoportnál növelte a különbségeket úgy, hogy az aktivált sejtek citokintermelése nőtt a nem aktiválthoz viszonyítva. Míg a RvD1-gyel kezelt BM-MSK-KM hatására azt látjuk, hogy a nem aktivált DC-ek IL-10 termelése növekszik a koncentráció függvényében, úgy az MSC1-KM hatására ugyanitt csökkenő tendenciát tapasztalunk.

Megállapítható, hogy az MSC-ek előkezelése több koncentrációban is befolyásolta azok hatását a DC-ek citokintermelésére, illetve itt is látunk különbségeket a két MSC sejttípus immunmoduláló hatásában.

7. Diszkusszió

Eredményeink alapján elmondható, hogy a resolvin-D1 kezelés erősebben befolyásolta a mezenchymális őssejtek fenotípusát, mint a HMGB1 (5. és 6. ábra). Az MSC-ek jelentős szerepet töltenek be a gyulladást követő regenerációs folyamatok során, ekkor számos, például leukocitákból származó faktor lehet jelen a mikrokörnyezetben, köztük az SPM-ek csoportjába tartozó resolvinok is (18, 26). Eddigi eredményeink alapján feltételezhetjük, hogy a resolvin-D1 MSC fenotípust befolyásoló hatása fokozhatja az őssejtek regenerációs folyamatokban betöltött szerepét, ezért további kutatások szükségesek, amik által részletesebben feltárjuk ezt a mechanizmust.

A különböző szövetekben elhelyezkedő MSC-ek eltérő fenotípussal rendelkeznek, különböző receptor mintázattal jellemezhetőek, ezért bizonyos anyagok iránti érzékenységükben is különbözőek lehetnek (17). Kezeléseink hatására a két vizsgált MSC sejttípus IL-6 és IL-8 termelésében is eltéréseket tapasztaltunk (7. ábra), eredményeinket további vizsgálatokkal tervezzük alátámasztani és fényt deríteni rá, miért nem detektáltunk IL-6 termelést a MSC1 esetében, annak ellenére, hogy a szakirodalom szerint szabályozó mechanizmusaik egyike az IL-6 termelés (27). MSC1 esetében tendenciális változást tapasztaltunk IL-8-nál HMGB1 kezelés hatására, látható, hogy a koncentráció növekedésével arányosan csökken a termelt IL-8 kemokin mennyisége, ezáltal kevesebb gyulladási folyamatokban részt vevő sejtet, például neutrofil granulocitát vonzanak a helyszínre, potenciális antiinflammatorikus hatást kiváltva ezzel.

A dendritikus sejtek fenotípusának vizsgálatakor szintén azt tapasztaltuk, hogy a két sejttípus eltérő hatást fejt ki bizonyos vizsgált markerekre, ezzel eltérő módon hatva az adaptív immunválasz milyenségére (9. és 10. ábra). BM-MS-ek esetében irodalmi adatokkal, illetve munkacsoportunk korábbi megfigyeléseivel összhangban (28) a kondicionált médium növelte a CD86 kifejeződését az aktiválatlan DC-ek felszínén, valamint PD-L2-nél is hasonló változást tapasztaltunk, ezen kívül a 100 ng/ml koncentrációjú HMGB1 jelentősen növelte a PD-L1 kifejeződését az aktivált DC-eken. Ezeknek a markereknek a befolyásolásával az MSC-ek a DC-ek kostimulációs profiljának befolyásolásán keresztül hatással lehetnek a kialakuló T-sejt válaszra, például a naiv T-sejt aktivációjára. A DC-ek monocitákból történő differenciációja során az izoláláshoz is használt CD14 molekula expressziója folyamatosan csökken. Az MSC-ek általánosságban csökkentik ezen differenciációs folyamat hatékonyságát, ezt eredményeink is alátámasztják, ugyanis az MSC-

ekből származó faktorok jelenlétében a CD14 expressziója nem csökkent a kezelést nem kapott DC csoporthoz képest.

További eredményeinkben láthatjuk, hogy a HMGB1 és RvD1 legmagasabb koncentrációjával kondicionált BM-MSC-ekről, illetve a MSC1-ről származó felülszóval kezelt aktiválatlan DC-ek esetében is csökkent az IP-10 termelés (11. ábra). A 150 ng/ml koncentrációjú HMGB1-gyel kezelt BM-MSC-KM szignifikánsan csökkentette az IP-10 termelést. Az IP-10 fontos a kialakuló antivirális válaszban, összefüggést mutat az APC-ek IFN- γ termelő képességével (29), ezáltal befolyásolhatja a Th1 és Tc választ vírusfertőzést követően. A továbbiakban ennek vizsgálatára tervezünk fókuszálni. A mezenchymális őssejtek egyik legfontosabb eszköze immunmodulációjuk során, hogy képesek fokozni a mieloid eredetű sejtek IL-10 termelését. Érdekes módon látványos különbséget figyeltünk meg a kontroll MSC-KM-mal kezelt DC-ek IL-10 termelésében, illetve mindkét sejt esetében a HMGB1 legmagasabb koncentrációja fokozta legnagyobb mértékben ezen citokin termelését. Ez fontos lehet a gyulladásos folyamatok rezolváló folyamatokba történő átmenete során, így a mechanizmus a MSC-ek rezolváló folyamatokban betöltött szerepére világíthat rá.

8. Összegzés

Összességében elmondható, hogy a különböző mezenchymális őssejtekkel végzett terápiák még fejlesztésre szorulnak, ehhez szükség van az általuk kifejtett immunmoduláció részletesebb tanulmányozására, megértésére. Munkánk során mi is igazoltuk azt a tényt, hogy a különböző szövetekből származó MSC-ek különbözőek funkcióikban, immunmodulációs tulajdonságaikban, máshogy hatnak rájuk a gyulladásos mikrokörnyezetben jelenlevő különböző anyagok. Ebben a tanulmányban olyan eredményeket mutattunk be, melyek jó kiindulási alapul szolgálhatnak további kutatásokban és hozzájárulhatnak az őssejt terápia hatékonyságának fejlesztéséhez.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Bácsi Attila Tanszékvezető Úrnak, hogy lehetővé tette az intézet kutatómunkájába való becsatlakozásomat és a kísérletek kivitelezését.

Szeretném megköszönni témavezetőmnek, Dr. Türk-Mázló Anettnek, hogy munkám során végig támogatott, bármikor fordulhattam hozzá kérdéseimmel, mindig türelmes és segítőkész volt.

Köszönöm Dr. Koncz Gábornak, hogy csatlakozhattam munkacsoportjához és igyekezett mindig hasznos tanácsokkal ellátni.

Hálás vagyok munkacsoportunk tagjainak és az Immunológia Intézet minden dolgozójának, aki valamilyen módon hozzájárult dolgozatom megírásához, különösképp köszönöm Bíró-Debreceni Zsuzsannának a kísérletek elvégzése során nyújtott segítségét.

Végül köszönettel tartozom családtagjaimnak, akik támogatnak céljaim elérésében.

10. Irodalomjegyzék

1. J. Parkin, B. Cohen, An overview of the immune system. *Lancet* **357**, 1777-1789 (2001).
2. T. Hanada, A. Yoshimura, Regulation of cytokine signaling and inflammation. *Cytokine Growth Factor Rev* **13**, 413-421 (2002).
3. P. J. Delves, I. M. Roitt, The immune system. First of two parts. *N Engl J Med* **343**, 37-49 (2000).
4. E. Bengten *et al.*, Immunoglobulin isotypes: structure, function, and genetics. *Curr Top Microbiol Immunol* **248**, 189-219 (2000).
5. O. Joffre, M. A. Nolte, R. Sporri, C. Reis e Sousa, Inflammatory signals in dendritic cell activation and the induction of adaptive immunity. *Immunol Rev* **227**, 234-247 (2009).
6. B. Pulendran, H. Tang, S. Manicassamy, Programming dendritic cells to induce T(H)2 and tolerogenic responses. *Nat Immunol* **11**, 647-655 (2010).
7. P. G. Fallon *et al.*, IL-4 induces characteristic Th2 responses even in the combined absence of IL-5, IL-9, and IL-13. *Immunity* **17**, 7-17 (2002).
8. N. Morishima, I. Mizoguchi, K. Takeda, J. Mizuguchi, T. Yoshimoto, TGF-beta is necessary for induction of IL-23R and Th17 differentiation by IL-6 and IL-23. *Biochem Biophys Res Commun* **386**, 105-110 (2009).
9. A. La Cava, Tregs are regulated by cytokines: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* **8**, 83-87 (2008).
10. G. M. Jogdand, S. Mohanty, S. Devadas, Regulators of Tfh Cell Differentiation. *Front Immunol* **7**, 520 (2016).
11. M. C. Bucknor, A. Gururajan, R. C. Dale, M. J. Hofer, A comprehensive approach to modeling maternal immune activation in rodents. *Front Neurosci* **16**, 1071976 (2022).
12. K. Kennerknecht *et al.*, Toll like-receptor agonist Pam(3)Cys modulates the immunogenicity of liposomes containing the tuberculosis vaccine candidate H56. *Med Microbiol Immunol* **209**, 163-176 (2020).
13. J. Le Naour, L. Galluzzi, L. Zitvogel, G. Kroemer, E. Vacchelli, Trial watch: TLR3 agonists in cancer therapy. *Oncoimmunology* **9**, 1771143 (2020).
14. A. Farina *et al.*, Epstein-Barr virus lytic infection promotes activation of Toll-like receptor 8 innate immune response in systemic sclerosis monocytes. *Arthritis Res Ther* **19**, 39 (2017).
15. M. P. Schon, M. Schon, Imiquimod: mode of action. *Br J Dermatol* **157 Suppl 2**, 8-13 (2007).
16. J. Kobolak, A. Dinnyes, A. Memic, A. Khademhosseini, A. Mobasheri, Mesenchymal stem cells: Identification, phenotypic characterization, biological properties and potential

- for regenerative medicine through biomaterial micro-engineering of their niche. *Methods* **99**, 62-68 (2016).
17. K. Zha *et al.*, Heterogeneity of mesenchymal stem cells in cartilage regeneration: from characterization to application. *NPJ Regen Med* **6**, 14 (2021).
 18. W. Jiang, J. Xu, Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Cell Prolif* **53**, e12712 (2020).
 19. M. Shahir *et al.*, Effect of mesenchymal stem cell-derived exosomes on the induction of mouse tolerogenic dendritic cells. *J Cell Physiol* **235**, 7043-7055 (2020).
 20. M. Najar *et al.*, Mesenchymal stromal cells and immunomodulation: A gathering of regulatory immune cells. *Cytotherapy* **18**, 160-171 (2016).
 21. W. Zhang *et al.*, Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Stem Cells Dev* **13**, 263-271 (2004).
 22. A. Mazlo *et al.*, Resolution Potential of Necrotic Cell Death Pathways. *Int J Mol Sci* **24**, (2022).
 23. D. Bertheloot, E. Latz, HMGB1, IL-1 α , IL-33 and S100 proteins: dual-function alarmins. *Cell Mol Immunol* **14**, 43-64 (2017).
 24. A. Mazlo *et al.*, Types of necroinflammation, the effect of cell death modalities on sterile inflammation. *Cell Death Dis* **13**, 423 (2022).
 25. M. C. Basil, B. D. Levy, Specialized pro-resolving mediators: endogenous regulators of infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **16**, 51-67 (2016).
 26. M. Yang, X. Q. Song, M. Han, H. Liu, The role of Resolvin D1 in liver diseases. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **160**, 106634 (2022).
 27. F. Djouad *et al.*, Mesenchymal stem cells inhibit the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells* **25**, 2025-2032 (2007).
 28. A. Mazlo *et al.*, MSC-like cells increase ability of monocyte-derived dendritic cells to polarize IL-17-/IL-10-producing T cells via CTLA-4. *iScience* **24**, 102312 (2021).
 29. I. Bacsikai *et al.*, Mesenchymal Stromal Cell-Like Cells Set the Balance of Stimulatory and Inhibitory Signals in Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Stem Cells Dev* **24**, 1805-1816 (2015).