

Pázmány Péter Katolikus Egyetem
Információs Technológiai és Bionikai Kar



Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskola

Széky Balázs

Kötőszöveti Őssejtek Vizsgálata Egészséges és Beteg Bőrben

Tézisek

Témavezető: Dr. Németh Krisztián PhD

Társ-témavezető: Dr. Gyöngy Miklós PhD

Budapest

2024

1. Bevezetés

A humán bőr kötőszöve (dermisz) számos őssejt-mikrokörnyezetet tartalmaz, amelyek a bőr magas regenerációs képességét biztosítják [1]-[3]. Noha a dermisz sejtes összetétele igen változatos, annak minden rétegében (papilláris, retikuláris, szubkután) megtalálhatóak a fibroblasztok, amelyek központi szerepet játszanak a dermális kötőszövet fenntartásában, valamint az szubkután zsírszövet, a szőrtüsző és az epidermális sejtek homeosztázisában [4]. A fibroblasztok heterogén populációjában őssejtes alpopulációkat azonosítottak, így például a dermális mezenhimális őssejtek [5], és a pluripotens MUSE (multilineage differentiating, stress enduring) sejtek [6] alpopulációit. Ezek az őssejtek figyelemre méltó multipotenciával jellemezhetőek, valamint számos mechanizmus útján részt vesznek a gyulladásos immunfolyamatok szabályozásában [7], [8]. Noha a szöveti regenerációban játszott szerepüket már vizsgálták, a dermális őssejtek előfordulásáról és funkciójáról a daganatos betegségekben, így a rosszindulatú melanómákban kevés ismeretünk van.

A tumormikrokörnyezetben megjelenő fibroblasztok a daganat növekedését számos mechanizmus útján befolyásolják, mint például a daganatellenes immunválaszok gátlásával [9], [10], vagy a daganat terjedésének citokinekkal [11], kemokinekkal [12], exoszómákkal [13], extracelluláris mátrix molekulákkal [14] és növekedési faktorokkal [15] való előmozdítása. Ezeket a kötőszöveti sejtek a tumorra való összetett kölcsönhatásaik után tumor-asszociált fibroblasztoknak (TAF) nevezzük. A TAF-ok a daganat mikrokörnyezetében változatos eredetűek, pericitákból, lokális fibroblasztokból, epiteliális sejtekből és adipocitákból változatos mechanizmusok útján keletkezhetnek [16]. A TAF-ok sejtpopulációs heterogenitását emlőrákban [17], gasztrointesztinális daganatokban [18], prosztatákban [19] és leukémiákban [20] már jellemezték, ugyanakkor a TAF alpopulációk fenotípusáról és funkcióikról az agresszív, metasztatikus melanómákban jelenleg kevés ismeretünk van.

A rosszindulatú melanoma egy rendkívül agresszív, terápia-rezisztens bőrdaganat, amelyet alacsony túlélési ráta és kedvezőtlen prognózis jellemeznek [21]-[23]. Noha az elsődleges tumor sebészeti úton könnyen eltávolítható, orvosi beavatkozás nélkül a melanómák rövid idő -általában 2-6 hónap- alatt metasztatikus stádiumba léphetnek. A melanómák mikrokörnyezetében számos sejtípus található, mint például a tumor

infiltráló makrofágok, immunosuppresszív T-sejtek, endotél sejtek, tumorőssejtek és a melanoma-asszociált fibroblasztok (MAF) [24]. Annak ellenére, hogy a MAF-ok jelentőségét a daganat növekedésében és terjedésében igazolták, a MAF-ok molekuláris markereiről és sejtes alpopulációinak fenotípusairól jelenleg korlátozott ismereteink vannak. Még kevesebbet tudunk a MAF-ok forrásaként szolgáló kötőszöveti őssejtekről, azok differenciációs képességéről és melanomát támogató funkcióikról.

Kutatómunkám során a MAF-ok specifikus sejtes markereit – beleértve a mezenhimális strómasejt markereket és kötőszöveti őssejt markereket -, valamint három csírvonal irányú differenciációját jellemeztem szubkután melanóma metasztázisokból izolált MAF-okat felhasználva. Mivel az SSEA3-pozitív MUSE sejtek fontos funkciókat töltenek be a szöveti regeneráció [25] és immunomoduláció folyamataiban [26], valamint melanocitákká differenciálódnak [26], ezért az *in vitro* kísérletes vizsgálataimat a MAF-ok között azonosított SSEA+ sejtpopulációra, annak pluripotenciájának és *in vitro* melanocita differenciációjának jellemzésére is kiterjesztettem.

2. Célkitűzések

A rosszindulatú metasztatikus melanómák a leghalálosabb bőrdaganatok, köszönhetően a melanóma sejtek gyors terjedésének és drog-rezisztenciájának. A melanóma sejteknek rendkívül magas differenciációs plaszticitása van, ezért képesek genetikailag heterogén tumorösszejt populációkat létrehozni. Ugyanakkor a MAF-ok stabil genotípusuk miatt a daganatellenes terápiák ígéretes célpontjaivá válnak. Azonban limitált információ áll rendelkezésre azon sejtes molekulákról, amik a MAF-ok specifikus azonosítását és targetálását biztosíthatják. Sőt, a MAF-ok differenciációs plaszticitásáról és annak a melanóma növekedésre gyakorolt hatásáról még kevesebb ismeretünk van.

Doktori kutatómunkám során a MAF-ok molekuláris fenotípusát és összejt tulajdonságait jellemeztem. A MAF-ok sejtfelszíni markereiről és differenciációs készségükről rendelkezésre álló limitált információ miatt az alábbi kérdésekre kerestem választ.

1. Milyen mezenhimális és kötőszöveti összejt markerek találhatóak a MAF sejteken?
2. Milyen különbség van a MAF-okban található összejtek és a normál bőr kötőszöveti összejtjeinek három csírvonal irányú differenciációjában?

Habár SSEA3+ strómális fibroblasztokat a dermiszben már azonosítottak, ezeknek a sejteknek a MAF-okban való jelenléte, mennyisége és differenciációs plaszticitása még nem ismertek. Ezért választ kerestem arra a kérdésre is, hogy

3. Pluripotens MUSE sejtek vajon a MAF-ok között is találhatóak-e? És ha igen, akkor
4. A melanómából származó MUSE sejtek képesek-e melanocitákká differenciálódni?

3. Kísérletes Módszerek

Etikai Nyilatkozat

A kísérletekhez felhasznált szöveti mintákat a Semmelweis Egyetem Bőr-, Nemikórtani és Bőronkológiai Klinikáján kaptuk. A sebészi úton eltávolított tumorokhoz és anyajegyekhez a páciensek tájékozott beleegyezése útján jutottunk. Kutatómunkánkat a Helsinkai Nyilatkozat alapelveivel összhangban, az Egészségügyi és Tudományos Tanács (ETT) Tudományos és Kutatásetikai Bizottságának (TUKEB) jóváhagyásával végeztük, (ETT TUKEB; 32/2007 számú rendelet, 32-2/2007 és 32-3/2007 kiegészítései).

Fibroblaszt Izolálás Egészséges és Melanómás Bőrből

Dermális fibroblaszt (DF) sejteket nem daganatos bőrből származó szöveti mintákból izoláltunk. A szöveti darabokat 2 órán keresztül diszpáz oldatban (Gibco, Gaithersburg, MT), 37 °C-on inkubáltuk. Ezt követően a diszpáz által emésztett epidermiszt a dermiszről csipesszel eltávolítottuk, a dermális szövetet pedig -15 percenkénti vortexelés mellett további 2 óráig kollagenáz-diszpáz oldatban (Gibco), 37 °C-on emésztettük. A szöveti aggregátumok eltávolításához az emésztett szövetet tartalmazó oldatot 70 µm szűrőn (Greiner Bio-one Ltd, Mosonmagyaróvár, Magyarország) átbocsájtottuk. Az így kapott sejtszuspenziót centrifugáltuk (400 rpm, 5 perc), majd 20% FBS-t (fetal bovine serum, Corning, Tewksbury, MA), 1% GlutaMax-ot (Gibco) és 1% penicillin/streptomycin-t (Pen/Step) tartalmazó DMEM (Dulbecco's modified eagle medium, Sigma Aldrich, St. Louis, MO) médiumban reszuszpendáltuk és a sejtszuspenziót sejtenyésző flakákba pipettáztuk. A sejteket 37 °C-on, 5% CO₂ mellett növesztettük, a sejtes médium felét minden harmadik napon friss médiumra cseréltük.

MAF-okat sebészi úton eltávolított melanóma mintákból, a páciensek tájékozott beleegyezését követően izoláltunk. A tumoros szövetet szikével leválasztottuk a nem-tumoros dermiszt, epidermiszt és szubkután zsírszövetet tartalmazó bőrtől, majd kollagenáz-diszpáz oldatban, 2 órán keresztül -15 percenként a mintát vortexelve emésztettük. A nagy méretű sejtes aggregátumokat 70 µm-es sejtes szűrővel eltávolítottuk, az így kapott sejtszuspenziót pedig 400 rpm-en 5 percig centrifugáltuk. A sejteket ezután 10% FBS-t, 1% GlutaMax-ot és 1% P/S-t tartalmazó DMEM médiumban,

25 cm²-es flaskában szélesztettük, majd 37 °C-on (5% CO₂ mellett) 30 percig inkubáltuk őket, hogy a MAF-ok letapadását biztosítsuk. A teljes felülúszót a benne maradó tumorsejtekkel együtt egy újabb 25 cm²-es sejtenyésző flaskába áthelyeztük, míg a letapadó MAF-okat tartalmazó flaskához friss, 20% FBS-t tartalmazó médiumot adtunk. A MAF-okat 37 °C-on, 5% CO₂ mellett növesztettük, a sejtes médium felét minden harmadik napon friss médiumra cseréltük.

In vitro Karakterizációs módszerek

Immunocitokémia

Immunocitokémiai jelöléshez a sejteket 4%-os paraformaldehid (PFA) oldatban, 15 percig fixáltuk, majd 0.2% Triton-X100 (Sigma) permeabilizáló oldattal 15 percig inkubáltuk és 2%-os borjú szérumalbumin (bovine serum albumin: BSA) oldatban egy óráig blokkoltuk. Ezt követően a sejteket a primer ellenanyagokkal egy teljes éjszakán keresztül -4 °C-on- inkubáltuk. Másodlagos antitest jelöléshez Cy3 fluoroforral konjugált anti-egér (kecske eredetű) vagy anti-nyúl (szamár eredetű) ellenanyagot használtunk, (Sigma). A sejtmagokat DAPI-val (4',6-diamidino-2-fenil-indol) megfestettük.

Az ektodermális, mezoermális és endodermális markerek antitest jelölésének optimalizálásához olyan immortalizált és tumoros eredetű sejtvonalakat használtunk, amelyek a sejtvonal-specifikus markereket nagy mennyiségben expresszálják, sejtkultúrában pedig gyorsan osztódnak. Az ektodermális csírvonal markerek (MAP2, ENO2, Nestin) festésének optimalizálásához az A172 glioblasztóma sejtvonalat, míg a melan-A melanocita marker immunfestéséhez az SKMEL-28 és MALME-3M melanóma sejtvonalat használtuk. A HEP3B hepatocelluláris karcinóma sejteket használtuk pozitív kontrollként az endodermális markerek (alfa-fetoprotein (AFP), albumin (ALB)) immunocitokémia jelöléséhez, míg a pluripotencia markerek immunfestéséhez (OCT_{3/4}, NANOG, TRA-1-60) az NTERA2 teratokarcinóma sejtvonalat választottuk.

Valós Idejű Kvantitatív PCR Taqman Próbákkal:

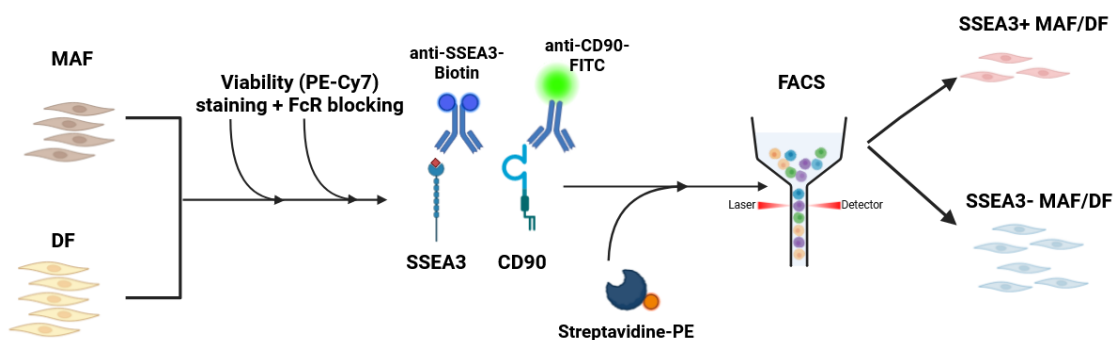
500.000-2000.000 fibroblaszt izolálásához a Qiagen RNeasy mini kit-et (Hilden, Németország) használtuk. A kit előírásainak megfelelően a sejtes mintákat RLT-pufferrel feltártuk, a nukleinsavakat etanollal precipitáltuk. A genomikus DNS eliminálásához a mintákat DNáz I enzimmel, szobahőmérsékleten, 30 percing inkubáltuk, majd a mintákat az RW és RPE pufferekkel RNS-kötő szűrőoszlopon átmostuk. Az RNS molekulák eluálásához a szűrőoszlopot nukleázmentes desztillált vízzel mostuk. Mintánként 1 µg RNS-t írtunk át cDNS-sé az MMLV reverz-transzkriptáz enzim (Promega, Madison, USA) felhasználásával, oligo-dT primerekkel. A qPCR mérésekhez FAM-MGB fluoroforral konjugált Taqman próbákat (Thermo Scientific) használtunk. House-keeping kontrolként a GAPDH-ra (glyceraldehyde 3-phosphate dehidrogenase) specifikus Taqman próbát alkalmaztunk. A reakció elegyeket 50 °C-on, 2 percing inkubáltuk, majd 95 °C-on, 10 percing denaturáltuk. A cDNS amplifikációhoz 40 ciklust indítottunk, amelyek 95 °C, 15 másodperc denaturációt, 60 °C 1 perc, valamint 72 °C, 1 másodperc inkubációt tartalmaztak. A differenciálatlan sejteket használtuk belső, normalizációs kontrolként a C_T értékek kiszámításához.

Áramlási Citometria és Fluoreszcencia-aktivált Sejtszortolás

Áramlási citometriás mérésekhez mintánként 200.000 sejtet helyeztünk PBS-ben (phosphate-buffered saline) citometriás csövekbe, majd a mintákat centrifugáltuk (1000 rpm, 5 perc) és áramlási citometriás pufferben (2% FBS PBS-ben) reszuszpendáltuk. A MAF-okat 10 percing Fc-receptor blokkolóval (Thermo Fisher), majd 30 percing FITC-konjugált CD90, APC-konjugált CD271 és PE-konjugált SSEA3 antitestekkel (eBioScience, USA), valamint a 7AAD (7-amino-actinomycin-D) viabilitási festékekkel inkubáltuk. Az antitest jelölést követően a mintákat áramlási citometriás pufferrel mostuk, a mérésekhez minden mintát 500 µl áramlási citometriás pufferben reszuszpendáltunk. A kompenzációs ('single color') mintákat CD90-PE, CD105-APC és CD90-FITC ellenanyagokkal (eBioScience) jelöltük, a 7AAD-kontrolhoz 100% metanolban inkubált sejteket használtunk. Negatív kontrolként a festetlen sejteket alkalmaztunk.

Az SSEA3+ sejtek fluoreszcencia aktivált szortolásához (fluorescence-activated cell sorting: FACS) a MAF és DF sejteket SSEA3+ biotiniált ellenanyaggal jelöltük meg, amelyhez

a biotint nagy affinitással kötő PE-streptavidint adtunk, (1.ábra). A FACS-hoz 5-10 millió MAF-ból készítettünk sejtszuszpenziót. A sejteket PBS-ben mostunk és fixálható nIR viabilitási festéssel (PE-Cy7) festettük (Thermo Fisher) a gyártó előírásainak megfelelően. A sejteket FACS pufferben (0.5% BSA, 2mM EDTA) mostuk és Fc-receptor blokkolóval 10 percig inkubáltuk. Ezt követően a mintákat 10 ng/μl biotin-konjugált SSEA3-antitesttel és 4 ng/μl FITC-konjugált antitesttel jelöltük 30 percig, 4 °C-on. A sejteket FACS pufferben mostuk, majd 30 percig 750 ng/ml PE-streptavidinnel jelöltük. Ezt követően a sejteket ismét FACS pufferben mostuk, majd a méréshez minden mintát 500 μl FACS pufferben felvettünk. A mérésekhez és a szortoláshoz az MA900 szortert használtuk (Sony Biotechnology, San Diego, USA). Az FSC/SSC (forward scatter/side scatter) plot-on fő sejtes populáción belül az élő (nIR-negatív) sejtekre kapuztunk, ezen populáción pedig a CD90+SSEA3+ kettős pozitív sejtekre állítottunk szorter kaput.



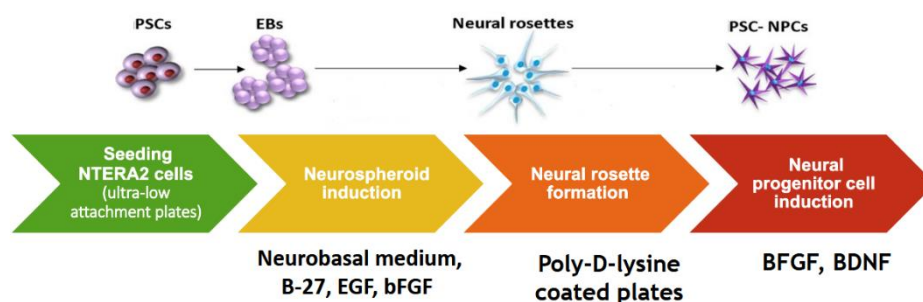
1. ábra: a CD90+SSEA3+ sejtekhez használt jelölési módszer. MAF és DF sejteket a nIR (PE-Cy7) viabilitási festéssel, majd Fc-receptor blokkolóval inkubáltunk. A blokkolást követően a CD90-et és az SSEA3-at FITC-konjugált anti-CD90 és biotin-konjugált anti-SSEA3 ellenanyagokkal megjelöltük. Az SSEA3 ellenanyaghoz kötött biotin molekulákhoz a PE-konjugált streptavidin nagy affinitással kötődik, így elősegíti az SSEA3-festésből eredő szignál amplifikációját. A FACS során az SSEA3+CD90+ és SSEA3- MAF/DF sejteket szortoltuk, és a szortolással kapott SSEA3+ és SSEA3-sejtpopulációkat további kísérletekhez felhasználtuk.

In Vitro Differenciációs Esszék:

Ektodermális Differenciáció:

In Vitro Neurális Differenciáció:

Neurális differenciáció indukálásához 100.000 sejt/cm² sejtsűrűséggel tettünk ki sejteket non-adherens sejttenyésztő edényekbe ('ultra-low attachment plates', Corning), B27-tel (1X), N2-vel (1X), 1% Pen/Strep-nel, 30 ng/ml EGF (Epidermal Growth Factor, Peprotech, London) és 30 ng/mL bFGF-fel (basic Fibroblast Growth Factor, Peprotech) kompletált neurobazális médiumban (Gibco), (2. ábra). A médiumot minden másnap cseréltük a 14. napig, majd a kialakult neuroszferoidokat poli-D-lizinnel kezelt sejttenyésztő edényekbe helyeztük át. A neurális differenciáció indukálásához a letapadó sejteket 10 napig 2% FBS-sel, 1% Pen/Strep-nel, 25 ng/ml EGF-fel és 25 ng/ml BDNF-fel (Brain-derived Neurotrophic Factor) kiegészített α -MEM médiumban növesztettük. Az indukció végén a neurális markerek expresszióját a sejtekben immunocitokémiai festéssel és qPCR méréssel vizsgáltuk.

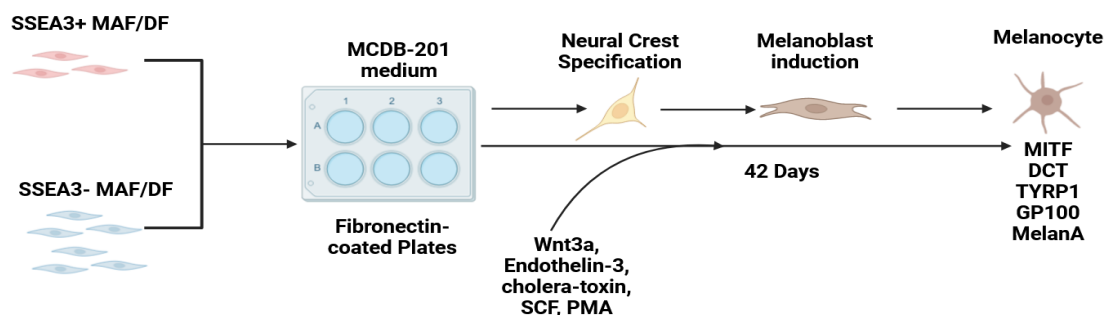


2. ábra. A neurális differenciációra kidolgozott protokoll, amelynek optimalizálásához NTERA2 sejteket használtunk. A sejtekből nem-letapadó sejttenyésztő flaskában szferoidokat növesztettünk 14 nap alatt B27-tel, N2-vel, EGF-fel és bFGF-fel kiegészített neurobazális médiumban. A 14. napon poli-D-lizinnel kezelt flaskákban a szferoidokat letapasztottuk. A neurális differenciáció indukálásához a sejteket 10 napig 2% FBS-t, bFGF-et és BDNF-et tartalmazó α -MEM médiumban tartottuk.

A neurális markerek expressziójának jellemzéséhez pozitív kontrollként az A172 glioblasztóma sejteket használtuk. A Nestin immunfestés átlagos intenzitását a differenciálatlan MAF-okban, differenciált MAF-okban és A172 sejtekben az ImageJ szoftverben kiszámoltuk, majd a DAPI festés átlagos intenzitására normalizáltuk.

In vitro Melanocita Differenciáció:

In vitro melanocita differenciációhoz Yamauchi és munkatársainak módszerét használtuk, [28], (3. ábra). Szortolt SSEA3⁺ és SSEA3⁻ sejteket a szortot követő napig fibronektinnel borított sejtenyésző edényekben tartottunk MAF médiumban, (20% FBS, 1% Pen/Strep, 1% GlutaMax). A következő napon a médiumot differenciációs médiumra cseréltük, amely 50% magas glükóz tartalmú DMEM-ből és 30% alacsony glükóz tartalmú DMEM-ből és 20% MCDB201 médiumból áll, valamint 0.05 M dexametazont, 100 µM L-aszorbinsavat, 1 mg/ml linolénsav-BSA-t, inzulin-transzferrin-szelénium oldatot (1X), 50 ng/ml SCF-et (Stem Cell Factor), 10 ng/ml endothelin 3-at (ET-3), 50 ng/ml Wnt3a-t, 20 pM kolera-toxint, 50 nM 12-O-tetradekanoil-forbol 13-acetátot (PMA) és 4 ng/ml bFGF-et tartalmaz. A sejteket ebben a médiumban 42 napig differenciáltattuk, majd a 42. napon a mintákban a melanocita markerek expresszióját immunocitokémiával és qPCR mérésekkel vizsgáltuk.



- 2. ábra: *in vitro* melanocita differenciáció MAF/DF sejtekből szortolt SSEA3⁺ és SSEA3⁻ sejteken.** A sejteket fibronektinnel borított sejtenyésző edényekben szélesztettük, a melanocita differenciációt pedig Wnt3a, ET-3, SCF, PMA és kolera-toxin hozzáadásával stimuláltuk. A 42. napig a differenciációs médiumot minden másnap cseréltük, majd a 42 napos mintákban a melanocita markerek (Melan-A, DCT, MITF, GP100, TYRP1) expresszióját jellemeztük.

In Vitro Mezodermális (oszteocita és Adipocita) Differenciáció

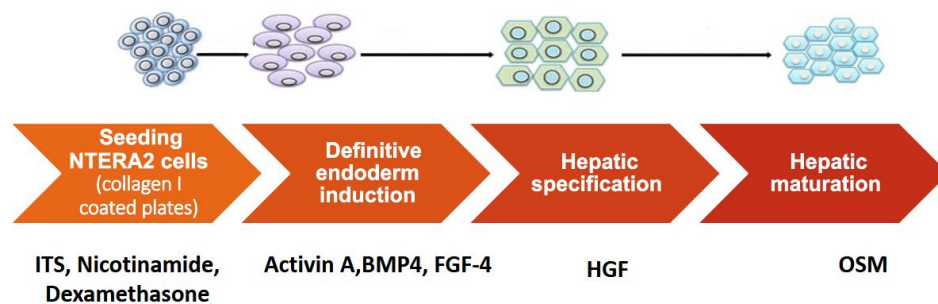
Oszteocita differenciáció indukálásához 1000.000 MAF sejtet szélesztettünk 6-lukú sejttenyésztő edényekben, 10 nM dexametazonnal, 100 µM aszkorbinsavval, 2mM glicerofoszfáttal, 20% FBS-sel, 1% GlutaMax-szal és 1% Pen/Strep-nel kiegészített DMEM médiumban. A differenciáció 21. napjáig a médiumot minden harmadik nap cseréltük. A 21. napon a sejteket 4% PFA-val, 15 percig fixáltuk, majd a differenciáció során képződő kalcium-foszfát komplexeket Alizarin Red S (ARS) festékkel, 30 percig megfestettük. A festett mintákat desztillált vízzel négyszer mostuk. A kalcium-foszfát komplexekhez kötött ARS-t 20 mM ecetsavval extraháltuk, a kivont festék koncentrációját OD₄₅₀ méréssel meghatároztuk. Az OD₄₅₀ mérés mellett a az oszteocita markerek expresszióját immunocitokémiával és qPCR méréssel vizsgáltuk.

Adipocita differenciációhoz 1000.000 MAF-ot szélesztettünk 6-lukú plate-ekben, 0.5 mM 3-izobutil-2-metilxantint (IBMX), 50 µM indometacint, 0.5 µM hidrokortizont, 10 µM rekombináns humán inzulint és 10 uM troglitazont, valamint 20 % FBS-t, 1% GlutaMax-ot és 1% Pen/Strep-et tartalmazó DMEM médiumban. A differenciációs médiumot minden 3. napon cseréltük. A 21 napos mintákban a lipidcseppek megfestéséhez a sejteket 4% PFA-val 15 percig fixáltuk, 60%-os izopropanollal mostuk, majd 15 percig az Oil-Red O (ORO) lipofil festékkel inkubáltuk. Az ORO-t a lipidcseppekből 60% izopropanollal extraháltuk, az intracelluláris ORO koncentrációt OD₅₀₆ méréssel meghatároztuk. Az adipocita markerek expresszióját immunocitokémiával és qPCR méréssel jellemeztük

In Vitro Endodermális (Hepatocita) Differenciáció:

Hepatocita differenciációhoz kétféle módszert teszteltünk, amelyeket Mallana és munkatársai [29], valamint Wakao és munkatársai [30] publikáltak. Az első módszer alapján 2×10^4 sejt/cm² sűrűségben a sejteket borjú kollagén-I-gyel kezelt sejttenyésztő flaskában szélesztettük, hepatocita differenciációs médiumban, (HDM: 10% FBS, 1X inzulin-transzferin-szelénium (ITS), 10 nM dexametazon, 0.6 mg/ml nikotinamid), (4. ábra). A differenciáció első két napjában a HDM-hez 10 ng/ml BMP4-et (Bone-morphogenic Protein-4, RnD), 50 ng/ml FGF4-et (Fibroblast Growth Factor 4) és 100 ng/ml aktivin-A-t (RnD) adtunk. A 2. és 5. napok között a sejteket 100 ng/ml Aktivin-A-val kiegészített HDM-ben tartottuk. Az 5. és 10. napok között a HDM-hez 20 ng/ml BMP4-et,

50 ng/ml FGF4-et adtunk, ezt a médiumot minden második napon friss médiumra cseréltük. A 10. és 15. napon a HDM-et 100 ng/ml HGF-fel (Hepatocyte Growth Factor, Peprotech) egészítettük ki, a médiumot a 15. napig minden másnap cseréltük. A 15. és 20. napok között a HDM-hez 20 ng/ml OSM-et (Oncostatin-M) adtunk. A 20 napos mintákban a hepatocita marker expressziót immunocitokémiával és qPCR mérésel vizsgáltuk, pozitív kontrollként a Hep3B hepatocelluláris karcinóma sejtvonalat használtuk. Az AFP és albumin immunfestések átlag intenzitásainak kiszámolásához a differenciálatlan MAF, differenciáltatott MAF és HEP3B sejtekben az ImageJ szoftvert használtuk. Az átlag intenzitás értékeket a DAPI festés átlag intenzitására normalizáltuk.



3. ábra: *in vitro* hepatocita differenciáció. A sejteket kollagén I-gyel kezelt sejttenyésztő edényekben szélesztettük HDM-ben, amely ITS-t, nikotinamidot és dexametazont tartalmaz. A definitív endoderm-szerű sejteket aktivin-A, BMP4 és FGF4 hozzáadásával differenciáltattuk. A hepatocita specifikációt HGF-fel stimuláltuk, a maturációt pedig OSM-mel serkentettük. (Az egyes citokinek hozzáadásának időzítéséhez lásd a módszer részletes leírását).

A Wakao és munkatársai által publikált módszer alapján [30] a sejteket kollagén I-el kezelt sejttenyésztő edényekben szélesztettük 2×10^4 cells/cm² sűrűségben. Hepatocita differenciációs médiumként ITS-t, 10 nM dexametazont, 10% FBS-t, 100 ng/ml HGF-et és 50 ng/ml FGF4-et tartalmazó DMEM médiumot használtunk, amelyet minden harmadik napon cseréltünk. A 14 napos mintákban a hepatocita markerek expresszióját immunocitokémiával és qPCR mérésel vizsgáltuk.

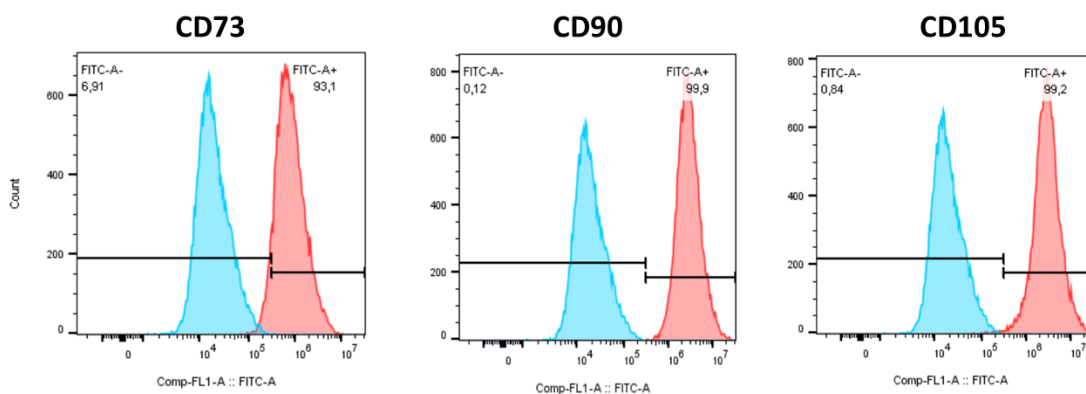
3.5. Statisztikai Analízis

Statisztikai analízishez a GraphPad Prism szoftvert (5. verzió) használtuk. A relatív mRNS expressziók statisztikai összehasonlításához a kontrol és differenciáltatott minták között két-utas ANOVA tesztet használtunk Bonferroni korrekció (post-hoc) tesztel. Ugyanezt a tesztet alkalmaztuk a CD146, CD271 és SSEA3 expressziók összehasonlításához a MAF és DF sejtek között. Párosított Student T-próbát alkalmaztunk az oszteocita és adipocita differenciációnál az ORO és ARS koncentrációk összehasonlításához a kontrol és differenciáltatott MAF/DF sejtek között. Az ALPL, CEBP α , Nestin és albumin immunocitokémiai festéseiből kapott normalizált átlag intenzitások összehasonlításánál Kruskal-Wallis tesztet használtunk a Dunn féle post-hoc tesztel. A statisztikai elemzésekhez 95%-os konfidencia intervallumot választottunk.

4. Tézisek

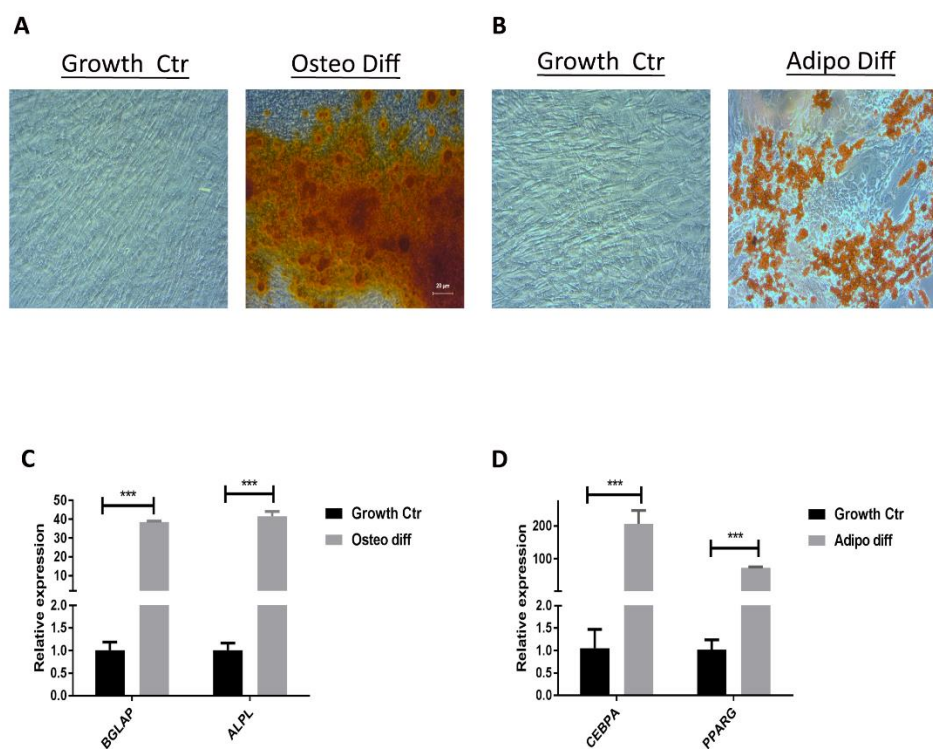
Tézis 1: A MAF-ok a Csontvelői Mezenhimális Őssejtek Fenotipikus Tulajdonságait Mutatják

A szubkután melanóma metasztázisokból izolált MAF-ok a mezenhimális őssejtekre (Mesenchymal Stem Cell: MSC) jellemző, orsó alakú morfológiát mutatták, illetve a mezenhimális őssejtekhez hasonlóan a plastik sejtenyésztő flaska felületéhez letapadtak. A MAF-ok további MSC tulajdonságainak vizsgálatához az MSC-specifikus sejtfelszíni markerek expresszióját áramlási citometriával kvantitáltuk, (5. ábra). Megmutattuk, hogy a MAF-okon a kanonikus MSC markerek, mint a CD73, CD90 és CD105 kifejeződnek. Annak megválaszolásához, hogy a MAF-ok az MSC-k differenciációs képességeit mutatják-e, a MAF sejtek mezodermális irányú differenciációját (oszteocita és adipocita differenciáció) *in vitro* esszékben vizsgáltuk, (6. ábra). A differenciáltatott MAF kultúrákban ARS festéssel kimutatható kalcium-foszfát komplexek jelentek meg oszteocita differenciáció során (6/A ábra), az adipocita differenciációs mintákban pedig ORO festéssel kimutattuk a lipid cseppeket, (6/B ábra).

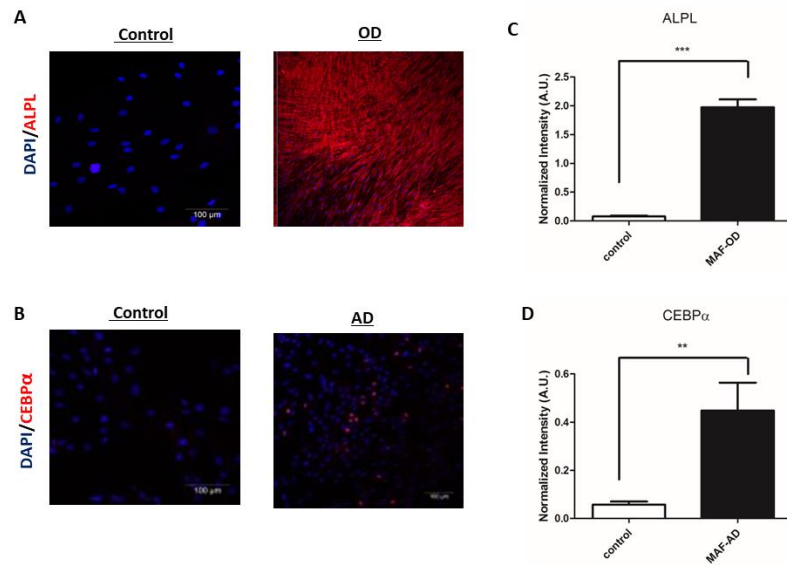


5. ábra. A MAF-ok a csontvelői MSC-kre jellemző fenotípust mutatják. A CD73, CD90 és CD105 kanonikus MSC markerek expresszióját áramlási citometriával mértük. A mérésekhez mintánként 200.000-300.000 MAF-ot jelöltünk a FITC-konjugált anti-CD73, anti-CD90 és anti-CD105 ellenanyagokkal. (N=5 MAF és DF sejtet mértünk különböző donorokból, háromszori ismétléssel).

QPCR mérésekkel az oszteocita irányba differenciáltatott MAF-okban detektáltuk a *BGLAP* és *ALPL* oszteocita markerek (6/C ábra), illetve a *PPARG* és *CEBPA* adipocita markerek kifejeződését, (6/D ábra). Továbbá az oszteocita differenciációs mintákban immunfestéssel kimutattuk az alkalikus foszfatáz (ALPL) enzim expresszióját (7/A, C ábra), az adipocita differenciációs mintákban pedig adipocita-specifikus markerként a CEBP α (CCAAT enhancer binding protein α) transzkripció faktor kifejeződését, (7/B, D ábra). Eredményeink alapján a MAF-ok az MSC-kre jellemző sejtfelszíni markereket expresszálják, valamint képesek *in vitro* oszteocita és adipocita differenciációra.



6. ábra: a MAF-ok a csontvelői MSC-kre jellemző mezodermális differenciációt mutatják. A reprezentatív képeken ARS festéssel a MAF-eredetű oszteociták kalcium-foszfat komplexei láthatóak (A), míg a MAF-eredetű adipocitákban ORO festéssel lipid cseppeket detektáltunk (B). Az oszteocita és adipocita differenciációt az oszteocita (*BGLAP*, *ALPL*) (C) és adipocita markerek (*PPARG*, *CEBPA*) (D) expressziójának qPCR mérésével is jellemeztük. (Housekeeping kontrol génként a *GAPDH*-t használtuk. *: $p < 0.001$. A kísérleteket $N=5$ különböző MAF donorból származó sejteken, háromszori ismétléssel végeztük).**

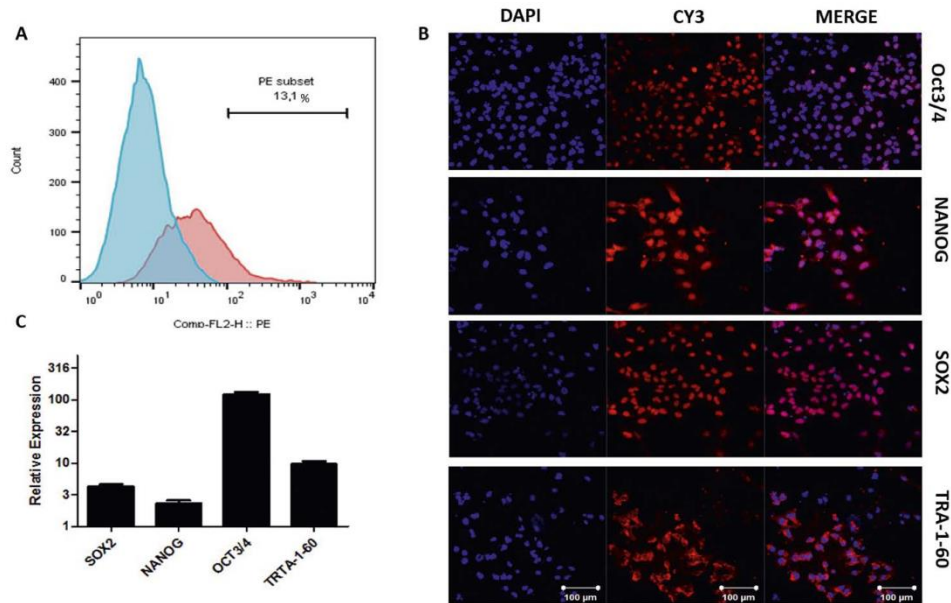


7.ábra: az ALPL oszteocita marker és a CEBPα adipocita marker expressziója MAF-eredetű oszteocita és adipocita sejtekben. (A) Az alkalikus foszfatáz oszteocita marker immunocitokémiai festése differenciálatlan és oszteocita irányban differenciáltatott MAF-okban. (B) A CEBPα adipocita marker immunocitokémiai festése differenciálatlan és adipocita irányban differenciáltatott MAF-okban. (A képeken 100μm skála jelölés található). Az ALPL (C) és CEBPα (D) DAPI festésekhez számolt, normalizált átlagos intenzitás értékek. (***: $P < 0.01$; **: $0.01 < p < 0.05$. A kísérleteket $N=5$ különböző donorból származó MAF-on, háromszori ismétléssel végeztük).

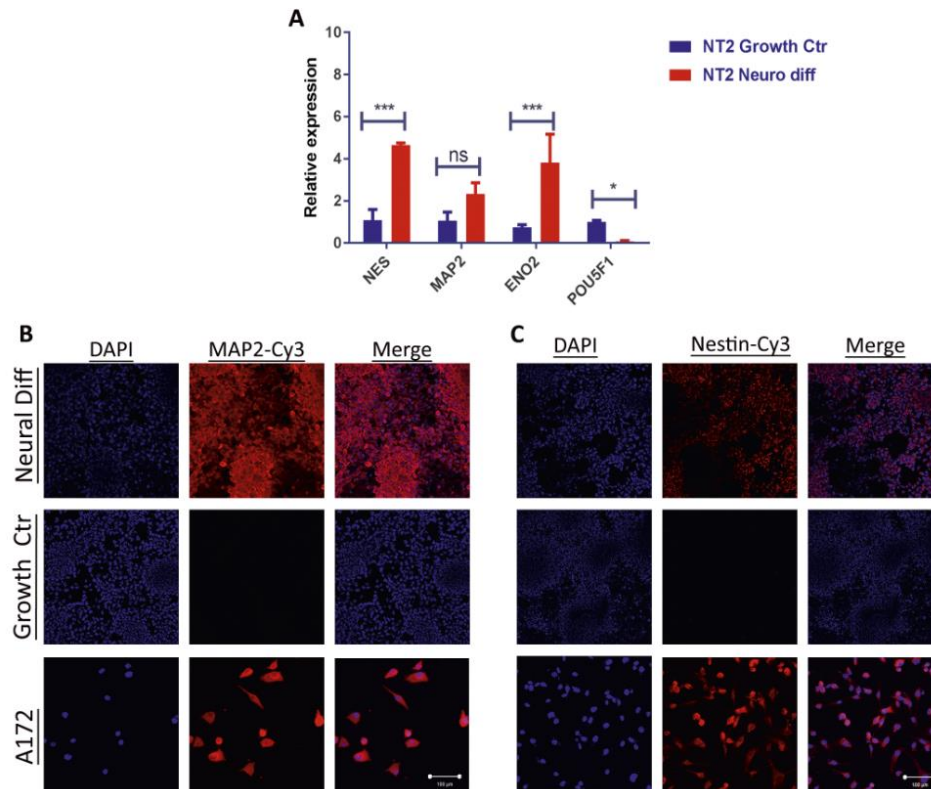
Tézis 2: Az NTERA2 Sejtek Neurális, Hepatocita és Oszteocita Irányba Differenciálódnak

Az NTERA2 sejtekben immunocitokémiai festéssel és qPCR mérésekkel detektáltuk a pluripotens őssejt markereket (Oct3/4, NANOG, TRA-160, Sox2, 8. ábra), [1]. Az NTERA2 sejtek felhasználásával optimalizáltuk *in vitro* neurális (9. ábra), hepatocita (10. ábra) és oszteocita differenciációs esszénket, (11. ábra). Az A172 és HEP3B sejtvonalak pozitív kontrolként való felhasználásával az NTERA2 sejtek neurális és hepatocita irányú differenciációját igazoltuk. Az NTERA2 sejtekből származtatott neurális sejtek a neurális őssejt markereket (Nestin, MAP2) és az ENO2 neuronális progenitor sejt markert expresszálták. Az NTERA2-eredetű hepatocita sejtek a fetális hepatocitákra jellemző markereket, így az albumint, AFP-t és a Citokeratin 18-at (CK18) expresszálták. Továbbá, az NTERA2 sejtekből differenciáltatott oszteocitákban detektáltuk a *BGLAP* és *ALPL*

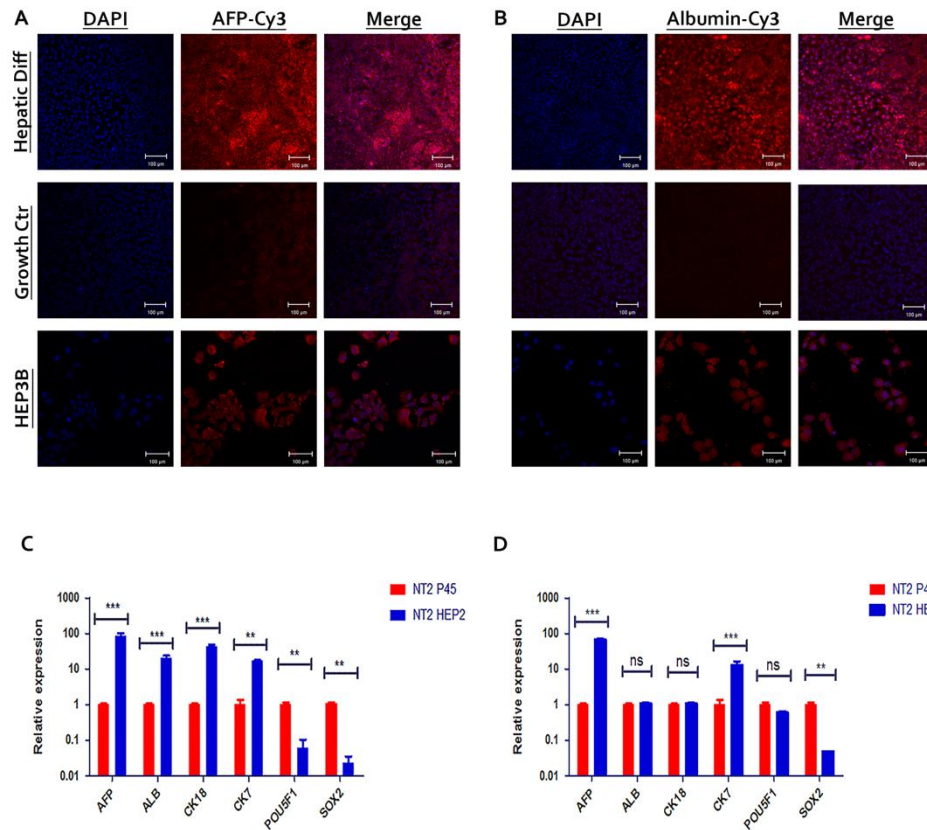
oszetocita markerek expresszióját. Eredményeink alátámasztják az NTERA2 (clone D1) sejtvonalban rejlő potenciált, hogy az embrionális és felnőtt pluripotens őssejtek (pl. MUSE sejtek) vizsgálatához könnyen fenntartható, költséghatékony pozitív kontrollként szolgáljanak.



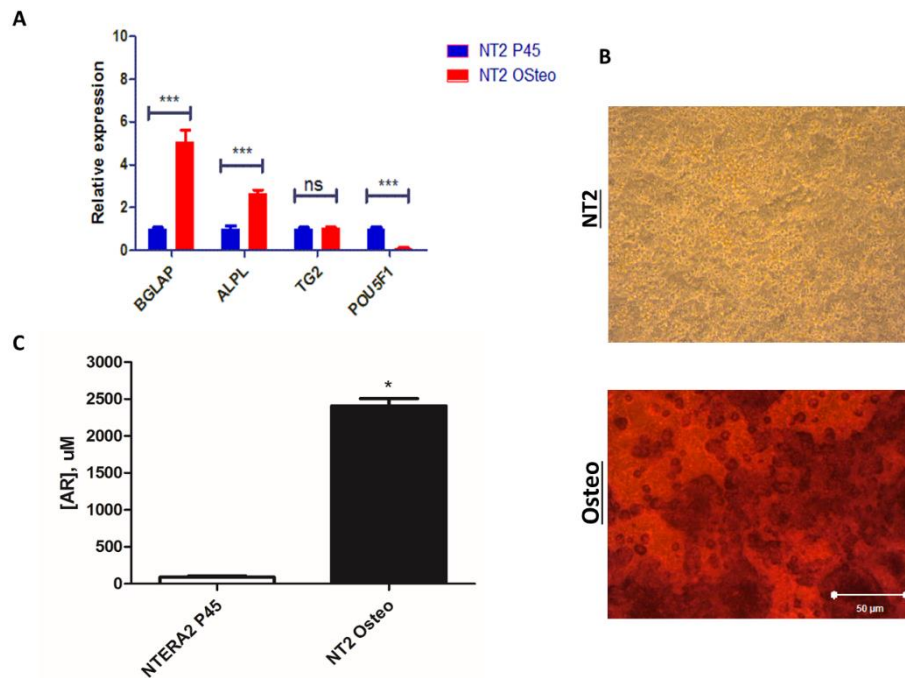
8. ábra: pluripotens őssejt markerek expressziójának vizsgálata az NTERA2 sejteken áramlási citometria, immunocitokémia és qPCR segítségével. (A) 200.000-500.000 NTERA2 sejtet megjelöltünk biotin-konjugált anti-SSEA3 ellenanyaggal, majd a sejteket PE-konjugált streptavidinnel inkubáltuk. Az SSEA3+ sejtek arányát (piros hisztogram) áramlási citometriás méréssel jellemeztük, negatív kontrollként (kék hisztogram) a primer antitest nélkül -csak PE-streptavidinnel- inkubált sejteket használtuk. (B) Pluripotens őssejt markerek (Oct3/4, Nanog, Sox2 and TRA-1-60) immunocitokémiai festése az NTERA2 sejteken. A sejtmagokat DAPI-val festettük meg. (Skála: 100 μm) (C) A B ábrán feltüntetett pluripotencia markerek mRNA-szintű expressziójának qPCR-rel való jellemzése. Housekeeping kontrollként a GAPDH Taqman próbáját használtuk, normalizációs kontrollként pedig dermális fibroblasztokból készített cDNS mintát. (Az eredmények háromszori ismétlésből származnak).



9. ábra: az NTERA2 sejtek neurális irányú differenciációja. (A) A neurális markerek relatív mRNS expressziója a differenciáltatott NTERA2 sejtekhez viszonyítva szignifikánsan emelkedett, míg a POU5F1 pluripotencia marker relatív mRNS expressziója csökkent. (House-keeping kontrolként a GAPDH Taqman próbáját, normalizációs kontrolként a differenciálatlan NTERA2 sejteket használtuk). A MAP2 (B) és Nestin (C) neurális markerek expresszióját az NTERA2 és A172 sejtekben immunocitokémiai festéssel -fehérje szinten is- detektáltuk, ezek a markerek a differenciálatlan NTERA2 sejtekben nem festődtek. (Skála; 100 μ m). (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, ns: nem-szignifikáns. A kísérleti eredmények háromszori ismétlésből származnak).



10. ábra: az NTERA2 sejtek in vitro hepatocita differenciációja. Az AFP (A) és albumin (B) expresszióját a 'HEP2' módszerrel előállított sejtekben és a HEP3B sejtekben immunocitokémiai festéssel igazoltuk, a differenciálatlan NTERA2 sejtekben ezek a markerek nem voltak kimutathatóak. (Skála; 100 μ m) (C) A hepatocita markerek (AFP, albumin, CK18, CK7) relatív mRNA expressziója a pozitív kontrol és HEP2 módszerrel előállított sejtekben a differenciálatlan kontrolhoz képest szignifikánsan megemelkedett, a POU5F1 és SOX2 markereké szignifikánsan csökkent. (D) Ezzel szemben a HEP1 módszerrel előállított sejtekben nem volt szignifikáns változás az ALB, CK18 és POU5F1 markerek expressziójában. (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$. A kísérleteket háromszori ismétléssel végeztük).

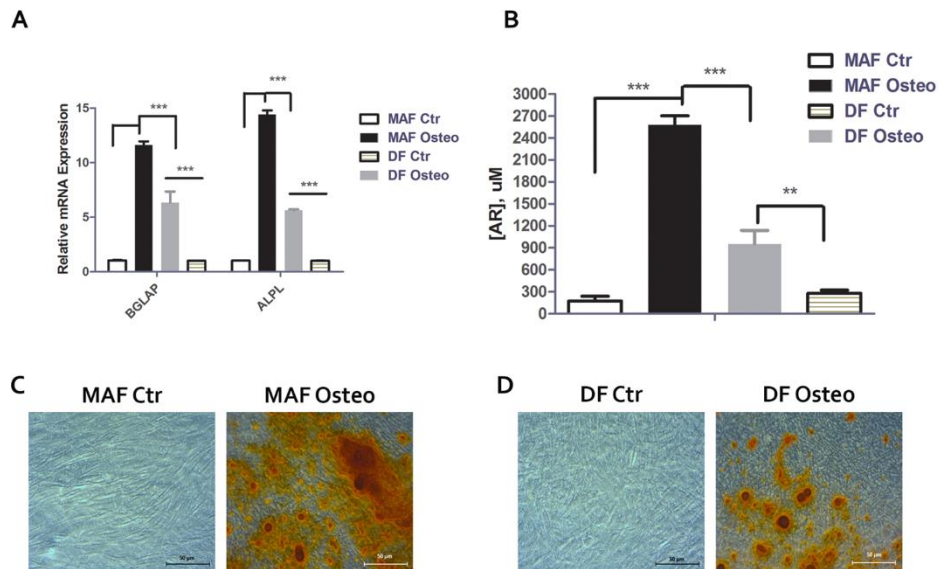


11. ábra: az NTERA2 sejtek oszteocita differenciációja. (A) qPCR mérésekkel az oszteocita markerek (BGLAP2, ALPL, TG2) relatív mRNS expressziójában szignifikáns növekedést figyeltünk meg, míg a POU5F1 pluripotencia marker expressziójában szignifikáns csökkenést detektáltunk. (B) ARS festéssel a differenciáltatott NTERA2 sejtekben a kalcium-foszfát komplexeket nagy mennyiségben kimutattuk, a differenciálatlan sejtek között nem detektáltunk kalcium-foszfát komplexeket. (C) A kalcium-foszfát komplexekből extrahált ARS koncentrációjának OD₄₅₀ mérésekkel való meghatározása differenciálatlan sejtekben és NTERA2-eredetű oszteocitákban. (Skála: 50 μm), (*: $p < 0.05$, ***: $p < 0.001$, ns: nem-szignifikáns. A kísérleteket háromszori ismétléssel végeztük.)

Tézis 3: A MAF-ok Differenciációs Potenciálja Nagyobb a Normál Dermális Fibroblasztokénál

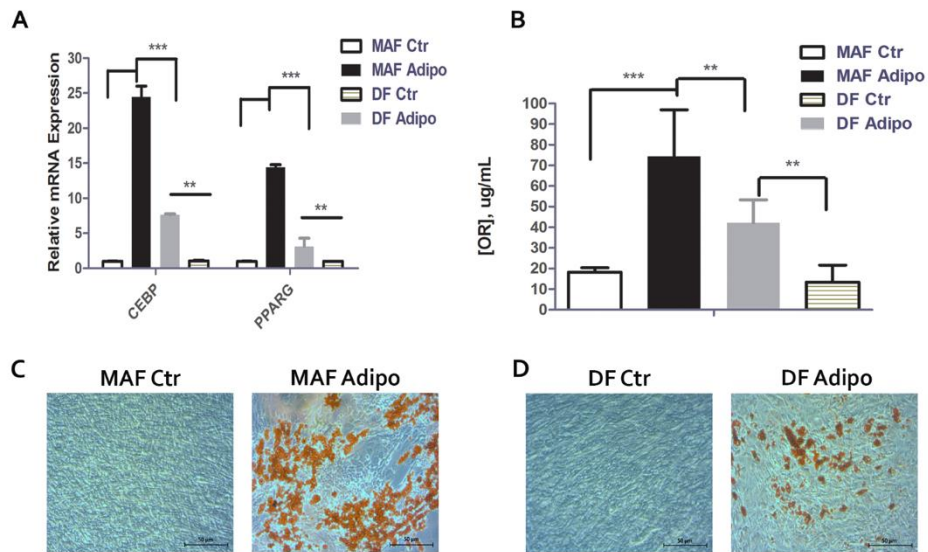
A MAF-ok mezodermális differenciációs potenciálját a DF-okéval *in vitro* oszteocita és adipocita differenciációs esszékben összehasonlítottuk. A MAF-ok a normál DF-oknál lényegesen nagyobb mértékben differenciálódtak mezodermális fenotípusú (oszteocita és adipocita) sejtekké, (12, 13. ábra). Következő lépésként a MAF-ok ektodermális (neuronális) és endodermális (hepatocita) differenciációját jellemeztük a pluripotens NTERA2 sejteken beállított módszerek felhasználásával. Nagy mértékű mezodermális

differenciációjuk mellett a MAF-ok MAP2+Nestin+ ektodermális sejtekké (14/B, D, F ábra), valamint AFP+albumin+ endodermális sejtekké (14/A, C, E ábra) differenciálódtak.



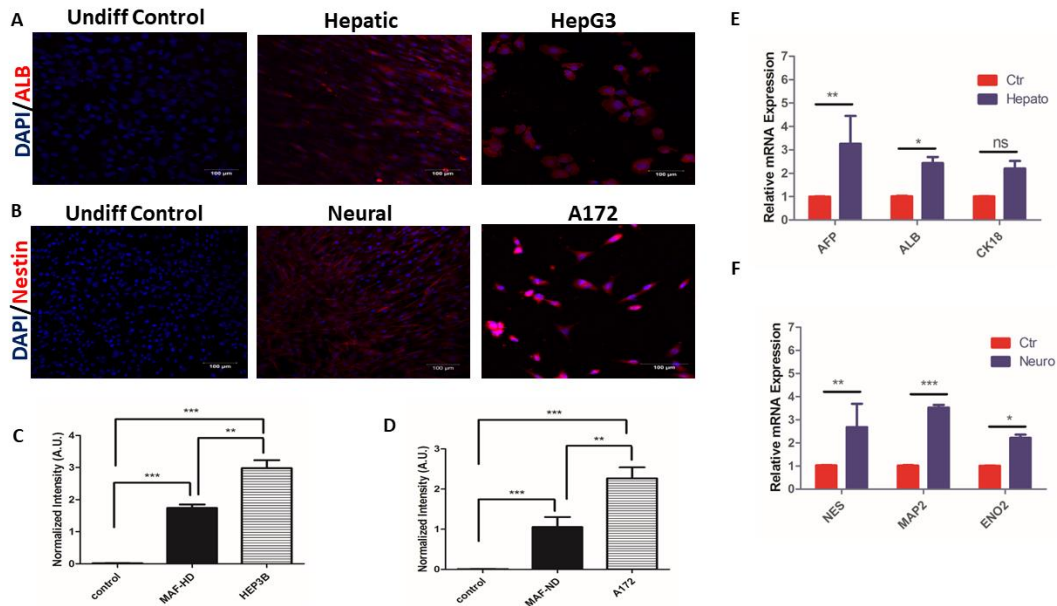
12. ábra: A MAF-ok oszteocita differenciációs potenciálja lényegesen nagyobb a DF-okénál.

(A) A BGLAP és ALPL oszteocita markerek relatív mRNS expressziója, amelyet qPCR mérésekkel határoztunk meg. Housekeeping kontrollként a GAPDH-t használtuk, az expressziós értékeket a nem differenciáltatott minta értékeire normalizáltuk. (B) A MAF és DF sejtekből, valamint azok oszteocita irányba differenciáltatott sejtjeiből kivont ARS koncentrációi, (μM -ban megadva). A differenciálatlan, valamint oszteocita irányba differenciáltatott DF (C) és MAF (D) sejtek kalcium-foszfát komplexeinek festődése reprezentatív képeken. (Skála; 50 μm). (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$. A kísérleteket $N= 5$ különböző donorból származó MAF és DF sejteken, háromszori ismétléssel végeztük).



13. ábra: A MAF-ok adipocita differenciációs potenciálja lényegesen nagyobb a DF-okénál.

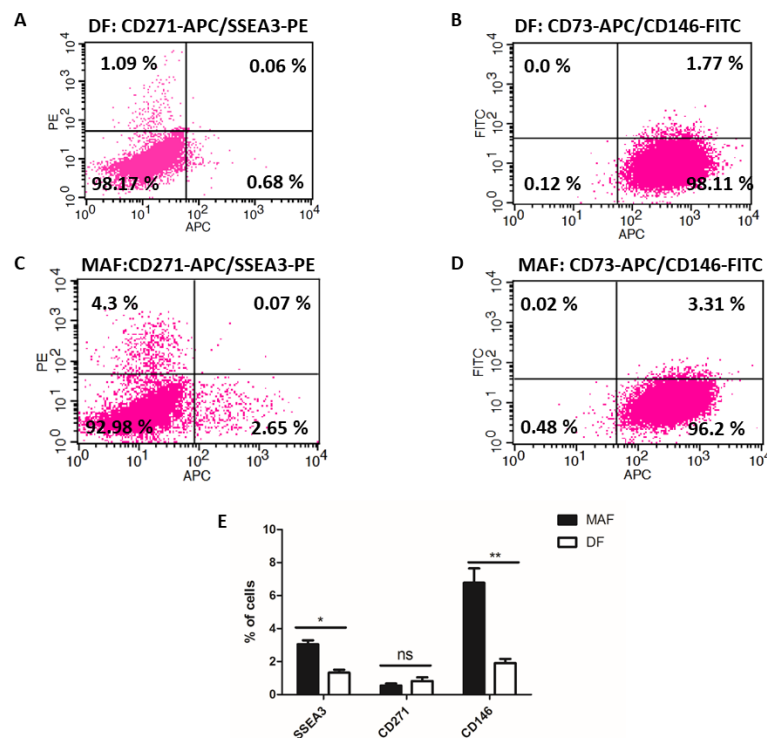
(A) A PPARG és CEBPA adipocita markerek relatív mRNS expressziója, amelyet qPCR mérésekkel határoztunk meg. Housekeeping kontrollként a GAPDH-t használtuk, az expressziós értékeket a nem differenciáltatott minta értékeire normalizáltuk. (B) A MAF és DF sejtekből, valamint azok adipocita irányba differenciáltatott sejtjeiből kivont ORO koncentrációi, ($\mu\text{g}/\text{mL}$ -ban megadva). A differenciálatlan, valamint adipocita irányba differenciáltatott DF (C) és MAF (D) sejtek lipid cseppjeinek festődése reprezentatív képeken. (Skála; 50 μm). (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$. A kísérleteket $N= 5$ különböző donorból származó MAF és DF sejteken, háromszori ismétléssel végeztük).



14.ábra: a MAF-ok in vitro neurális és hepatocita differenciációja. (A) A MAF-okat neurális irányba differenciáltattuk. A Nestin expresszióját immunocitokémiai festéssel jellemeztük. A sejtmagokat DAPI-val festettük. Bal oldal: differenciálatlan MAF sejtek, középen: neurális irányba differenciáltatott MAF sejtek, jobbra: A172 sejtek (pozitív kontrol). (Skála: 100 μ m). (B) A MAF sejteket hepatocita irányba differenciáltattuk, az albumin expresszióját immunocitokémiával vizsgáltuk. A sejtmagok festéséhez DAPI-t használtunk. Balra: differenciálatlan MAF sejtek, középen: hepatocita irányba differenciáltatott MAF sejtek, jobbra: HEP3B sejtek, (pozitív kontrol). (Skála: 100 μ m). (C) Az albumin festés átlagos intenzitása differenciálatlan MAF-okon, hepatocita irányba differenciáltatott MAF-okon, valamint HEP3B sejteket. Az intenzitás értékeket a DAPI átlagos intenzitására normalizáltuk. (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$). (D) A Nestin festés átlagos intenzitása differenciálatlan MAF-okon, neurális irányba differenciáltatott MAF-okon, valamint A172 sejteket. Az intenzitás értékeket a DAPI átlagos intenzitására normalizáltuk. (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$). (E) A Nestin, MAP2 és ENO2 neurális markerek expressziójának növekedését qPCR mérésekkel is megfigyeltük. (A mérésekhez a GAPDH használtuk housekeeping kontrolnak, a mintákat a differenciálatlan MAF-ok expressziós értékelire normalizáltuk.) (F) Az AFP, albumin és CK18 expresszióját qPCR mérésekkel is meghatároztuk. (A mérésekhez a GAPDH használtuk housekeeping kontrolnak, a mintákat a differenciálatlan MAF-ok expressziós értékeire normalizáltuk (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$, *: $p \leq 0.05$, ns: nem-szignifikáns. A kísérleteket N=3 különböző donorból származó MAF-ból, kétszeri ismétléssel végeztük.)

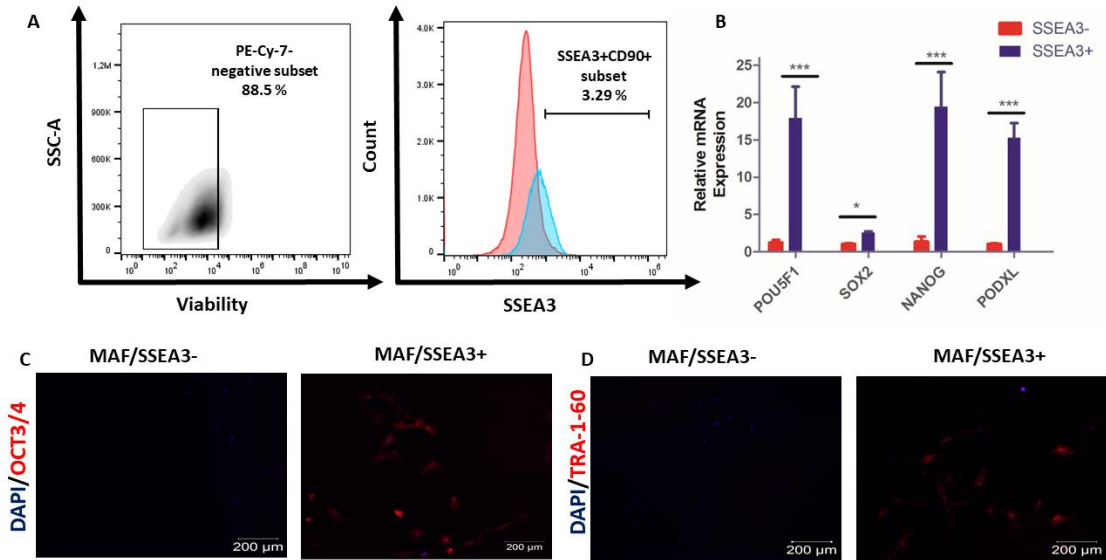
Tézis 4: A MAF-ok között MUSE Sejtek, valamint a CD146+ és CD271+ Össejt Populációk Megtalálhatóak.

Áramlási citometriás mérésekkel megmutattuk, hogy a MAF-ok között CD271+, CD146+ és SSEA3+ alpopulációk vannak, (15. ábra). Az SSEA3+ sejteket a különböző stromális állományokban (csontvelő, bőr, zsírszövet) multipotens, stressz-rezisztens sejtekként írták le, amelyek pluripotens össejt markereket expresszálnak, a gyulladásos immunfolyamatokat szabályozzák, valamint melanocitákká differenciálódnak, [6], [26].



15.ábra: stromális össejtmakerek expressziója normál DF-okban és MAF-okban A DF-okon (A-B) és MAF-okon (C-D) áramlási citometriás mérésekből készített dot-plotokon az SSEA3-PE/CD271-APC fluoreszcencia értékek (A, C), valamint a CD73-APC/CD146-FITC (B, D) fluoreszcencia értékek láthatóak. (E) Az SSEA3-at, CD27-et és CD146-ot expresszáló MAF és DF sejtek %-os arányai. A MAF-ok a DF-oknál szignifikánsan több CD146+ és SSEA3+ sejtet tartalmaznak. (**; $0.01 < p < 0.05$, *; $p < 0.05$, ns: nem-szignifikáns. A kísérleteket N=5 különböző donorból származó DF és MAF sejteken, háromszori ismétléssel végeztük. Az áramlási citometriás mérésekhez mintánként 20.000 eseményt detektáltunk.

A MAF-ok között azonosított SSEA3⁺ sejt alpopuláció karakterizálásához a MAF-okból SSEA3⁺CD90⁺ sejteket izoláltunk (16. ábra), amelyekben a pluripotencia markerek kifejeződését jellemeztük.

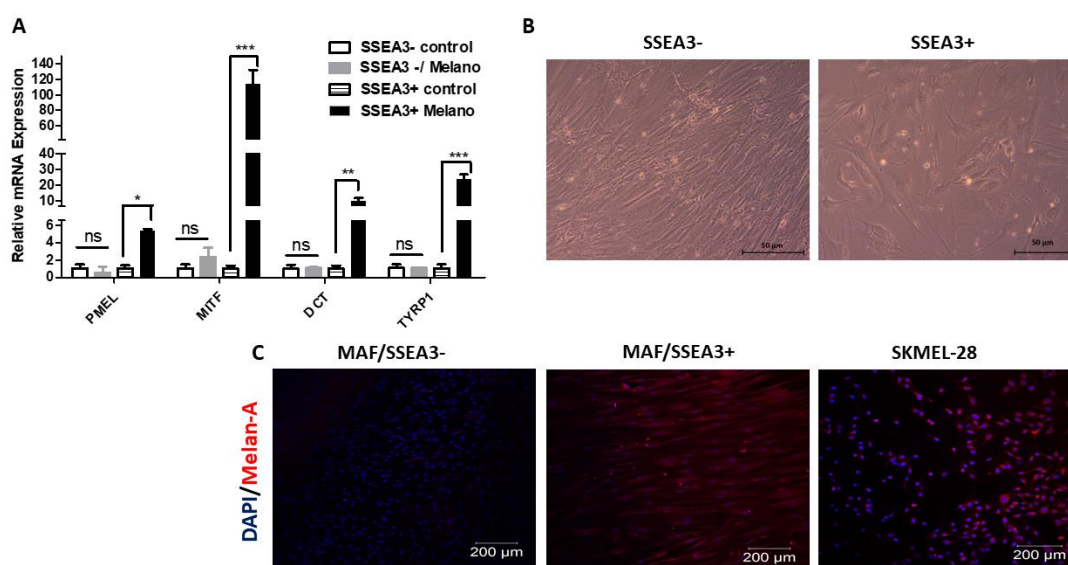


16. ábra: A MAF-ok között MUSE sejtek vannak. (A) A MUSE sejtek FACS-szal való izolálása. A szortolási kapukat az élő (PE-Cy-7 festésre negatív) sejtekre állítottuk, majd azokon belül az CD90⁺SSEA3⁺ alpopulációra. A szortolásokhoz 5-10 millió MAF sejtet használtunk, N=3 különböző donorból, kétszeri ismétléssel. A piros hisztogram a festetlen kontrollt ábrázolja, míg a kék hisztogram a FACS előtt az SSEA3⁺ sejteket. (B) A POU5F1, SOX2, NANOG és PODXL pluripotencia markerek expressziójának qPCR-rel való mérése. (Housekeeping kontrollként a GAPDH-t használtuk, az expressziós értékeket az SSEA3⁻ minták értékeire normalizáltuk). (C) A szortolt SSEA3⁺ sejtekben az Oct_{3/4} és TRA-1-60 pluripotencia markerek expresszióját immunocitokémiai festéssel kimutattuk, míg SSEA3⁻ sejtekben ezek a markerek nem festődtek. (Skála: 200 μm, a sejtmagokat DAPI-val festettük). (***: $p < 0.01$, *: $p \leq 0.05$)

Immunocitokémiai festéssel (16/C, D ábra) és qPCR mérésekkel (16/B ábra) megmutattuk, hogy az SSEA3⁺ MAF sejtek pluripotens őssejt markereket (Oct_{3/4}, SOX2, NANOG and TRA-1-60) expresszálnak. A MAF sejtek között tehát MUSE sejtek vannak, amelyek nem csak a kanonikus MSC markereket (CD90, CD105), de a pluripotens őssejt markereket is kifejezik.

Tézis 5: A MAF-eredetű MUSE Sejtek Melanocita Sejtekké Differenciálódnak

Miután a MAF-ok között a MUSE sejteket azonosítottuk, a MAF-eredetű MUSE sejtek *in vitro* melanocita differenciációját is megvizsgáltuk, (17. ábra). A MAF-eredetű MUSE sejtek hosszúkás, dendritikus morfológiájú, melanocita-szerű sejtekké differenciálódtak (17/B ábra), amelyek a melan-A-t expresszálják (17/C ábra). Ezzel szemben az SSEA-, non-MUSE sejtek nem differenciálódtak melan-A-pozitív sejtekké.



17. ábra: a MAF-eredetű MUSE sejtek *in vitro* melanocitákká differenciálódnak. A MAF sejtekből a MUSE sejteket CD90+SSEA3+ sejtekként szortoltuk. A szortolt SSEA3+ és SSEA3- sejteken, fibronektinnel kezelt sejttenyésztő edényekben 6 hetes melanocita differenciációt indukáltunk. (A) qPCR mérésekkel igazoltuk, hogy a PMEL, MITF és DCT melanocita markerek expressziója megnőtt a szortolt és melanocita irányban differenciáltatott MUSE sejtekben.

Housekeeping kontrolként a GAPDH-t használtuk, az eredményeket a differenciálatlan sejtekre normalizáltuk. (***: $p < 0.01$, **: $0.01 < p < 0.05$, *: $p < 0.05$). (B) Az SSEA3- sejtekkel szemben az SSEA3+ sejtek a melanocita differenciáció során dendritikus morfológiát alakítanak ki. (Fénymikroszkópos képek a 42 napos mintákon. Skála: 50 μ m). (C) Az SSEA3- sejtekkel (középső oszlop/lent) szemben az SSEA3+ sejtekben (középső oszlop/fent) és a pozitív kontrol (SKMEL-28) sejtekben (jobb oldal) immunocitokémiai festéssel detektáltuk a melan-A-t. (A sejtmagokat DAPI-val festettük, skála: 200 μ m). (N=5 különböző donorból származó MAF-ot használtunk a kísérlethez).

Sőt, a MAF-okból szortolt SSEA3- sejtekkel szemben a MAF-MUSE sejtekből differenciáltatott melanociták expresszálták az MITF (microphtalmia-associated transcription factor), DCT (dopachrome-tautomerase) és TYRP1 (tyrosinase-related protein-1) melanocita markereket, (17/A ábra).

5. Az Eredmények Alkalmazásai

A TAF-ok a tumormikrokörnyezet leggyakoribb sejtípusai, amelyek a daganatok sejtjeivel komplex kölcsönhatásban a daganat növekedését, immunoszuppresszív aktivitását, metasztázisát és drogrezisztenciáját szabályozzák. Noha a TAF-ok tumor promotáló funkcióit gátló terápiás módszerek már fejlesztés alatt állnak [31], a TAF-ok specifikus targetálását lehetővé tevő markerek azonosítása még folyamatban van. A tumorsejtekkel szemben a TAF-ok proliferációs rátája lényegesen alacsonyabb, következésképpen a TAF-ok a konvencionális kemoterápiás módszerekkel kevésbé támadhatóak. A TAF-specifikus molekulák azonosítása nagyban elősegítheti a tumor-promotáló TAF alpopulációk szelektív gátlását vagy eliminálását. Tekintve a TAF-ok magas szintű fenotipikus heterogenitását, a TAF-ok forrásaként szolgáló őssejtpopulációk feltárása fontos lépés a tumorok stróma sejtes utánpótlásának célzott gátlásában.

Annak ellenére, hogy a malignus melanóma egy rendkívül agresszív és drogrezisztens daganat, a melanóma mikrokörnyezetben létrejövő MAF-ok fenotípusáról és funkcióiról kevés ismeretünk van. Noha MAF-oknak a tumor-immunoszuppresszióban játszott szerepét több más tanulmány mellett már kutató laborunk is igazolta, [32], [II], a MAF-ok fenotipikus összetétele, őssejt alpopulációi és azok differenciációs plaszticitásása kevésbé ismertek. Doktori kutatómunkám eredményeként megmutattam, hogy a MAF-ok a csontvelői mezenhimális őssejtek molekuláris markereinek expresszióját és mezodermális differenciációját mutatják (5-7, 12, 13. ábra), továbbá multipotens differenciációs készség jellemzi őket, (14. ábra). Eredményeink alapján a MAF-ok között multipotens differenciációra képes őssejtpopulációk vannak. A MAF-ok magas differenciációs potenciálja egyúttal felveti az úgynevezett differenciációs terápia lehetőségét is, melynek során a MAF sejteket kismolekulák és molekuláris targetálási stratégiák kombinálásával olyan differenciált sejtekké (pl. adipocitákká) alakítsuk, amelyek a daganat növekedését támogató funkciójukat a differenciáció során elvesztik [33].

A MAF-ok differenciációjának vizsgálatához az NTERA2 sejteken olyan *in vitro* módszereket optimalizáltunk, amelyekkel a MAF-ok és őssejt populációik ektodermális (melanocita, neurális), mezodermális (oszteocita, adipocita) és endodermális (hepatocita) differenciációi vizsgálhatóak. Kísérleteink beállítása során kihasználtuk az NTERA2 sejtek azon előnyét, hogy a hagyományos pluripotens és indukált pluripotens sejtvonallakkal

szemben alacsonyabb reagens igény mellett növeszthetőek, pluripotens jellegüket több passzáson keresztül megőrzik. Megmutattuk, hogy az NTERA2 sejtek pluripotencia markereket expresszálnak, valamint képesek neurális, oszteocita és hepatocita differenciációra, (9-11. ábra). Eredményeink alátámasztják az NTERA2 sejtvonal azon előnyös tulajdonságát, hogy a pluripotens sejtek három csíravonal irányú differenciációjának modelljeként szolgálnak.

MSC tulajdonságaik karakterizációja mellett a MAF-ok között olyan strómális őssejt alpopulációkat azonosítottunk, amelyek differenciációs potenciáljuk és önmegújító képességük által a melanómában a tumor stróma utánpótlását biztosíthatják. A MAF-ok között kimutattuk a CD146+ és CD271+ strómális őssejtpopulációkat (15. ábra), amelyek a normál dermiszben fontos szerepet játszanak az immunomoduláció és az angiogenezis szabályozásában [34], [35]. További kísérletek szükségesek annak tisztázásához, hogy ezek a sejtpopulációk a melanómák immunosuppresszív és angiogénikus aktivitásában milyen szerepet játszanak. A CD146+ és CD271+ őssejt populációk mellett kimutattuk a MAF-ok között a MUSE sejteket (16. ábra), amely multipotens sejtek fizikokémiai stressz, gyulladás és szöveti sérülés hatására aktiválódnak. Tekintve, hogy a gyulladásos T-sejt reakciókat is szabályozni tudják, a MUSE sejtek jelentősége a melanómák növekedésében, immunosuppressziójában és drogrezisztenciájában egy fontos kérdés marad. Sőt, a MUSE sejtek melanocita differenciációs potenciálja felveti a kérdést, hogy a melanocita képességgel ezek az őssejtek mennyiben járulnak hozzá a melanóma megújulásához.

Összegezve eredményeinket, a melanómákban a MAF-ok MSC-szerű fenotípusának demonstrációja mellett, speciális MAF szubpopulációkat mutattunk, mint például a MUSE, CD146+ és CD271+ sejteket. További kutatómunka szükséges annak tisztázásához, hogy ezek a dermiszben is megtalálható strómális őssejtek a melanómában milyen funkciókat töltenek be, illetve mennyire alkalmas a targetálásuk a melanómák növekedésének és terjedésének visszaszorítására.

6. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Szolgay Péternek, aki dékánként a Roska Tamás Műszaki és Természettudományi Doktori Iskolában doktori tanulmányaimat lehetővé tette. Hálás vagyok dr. Kárpáti Sarolta Profeszor Asszonynak, amiért a SE, Bőrklinika Össejtkutató Laboratóriumában való munkámat engedélyezte és odaadással támogatta. Köszönetet mondok témavezetőimnek, Prof. Dr. Németh Krisztánnak és Prof. Dr. Gyöngy Miklósnak, hogy a kísérlettervezésben, előrehaladásban, cikkeim és a disszertációm megírásában támogatást, segítséget nyújtottak. Kísérleteim kivitelezésében nyújtott segítségével köszönetet mondok Dr. Mayer Balázs, Dr. Pós Zoltán, Dr. Érsek-Molnár Barbara és Dr. Barna Gábor felé, akik a citometriás mérésekben, sejt szortolásban, az eredmények analízisében segítségemre voltak. Továbbá köszönettel tartozom Dr. Silló Pálma, Mazán Mercédesz és Suba Adrien felé, akik a fibroblaszt izolálás és kvantitatív PCR technikáira megtanítottak. Végül, de nem utolsó sorban köszönöm kollégáimnak, Hajdara Annának, Chakir Ugrunak és Barsi Szilviának a kutatómunkában való segítőkész, együttműködő és támogató hozzáállását.

7. Irodalomjegyzék:

[1]: Feldman, A., Mukha, D., Maor, I. I., Sedov, E., Koren, E., Yosefzon, Y., Shlomi, T., & Fuchs, Y. (2019). Blimp1⁺ cells generate functional mouse sebaceous gland organoids in vitro. *Nature communications*, 10(1), 2348.

[2]: Heitman, N., Sennett, R., Mok, K. W., Saxena, N., Srivastava, D., Martino, P., Grisanti, L., Wang, Z., Ma'ayan, A., Rompolas, P., & Rendl, M. (2020). Dermal sheath contraction powers stem cell niche relocation during hair cycle regression. *Science (New York, N.Y.)*, 367(6474), 161–166.

[3]: Lim, X., Tan, S. H., Yu, K. L., Lim, S. B., & Nusse, R. (2016). Axin2 marks quiescent hair follicle bulge stem cells that are maintained by autocrine Wnt/ β -catenin signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(11), E1498–E1505.

[4]: Hsu, Y. C., Li, L., & Fuchs, E. (2014). Emerging interactions between skin stem cells and their niches. *Nature medicine*, 20(8), 847–856.

[5]: Vaculik, C., Schuster, C., Bauer, W., Iram, N., Pfisterer, K., Kramer, G., Reinisch, A., Strunk, D., & Elbe-Bürger, A. (2012). Human dermis harbors distinct mesenchymal stromal cell subsets. *The Journal of investigative dermatology*, 132(3 Pt 1), 563–574.

- [6]: Heneidi, S., Simerman, A. A., Keller, E., Singh, P., Li, X., Dumesic, D. A., & Chazenbalk, G. (2013). Awakened by cellular stress: isolation and characterization of a novel population of pluripotent stem cells derived from human adipose tissue. *PLoS one*, *8*(6), e64752.
- [7]: Bernardo, M. E., & Fibbe, W. E. (2013). Mesenchymal stromal cells: sensors and switchers of inflammation. *Cell stem cell*, *13*(4), 392–402.
- [8]: Gimeno, M. L., Fuertes, F., Barcala Tabarozzi, A. E., Attorressi, A. I., Cucchiani, R., Corrales, L., Oliveira, T. C., Sogayar, M. C., Labriola, L., Dewey, R. A., & Perone, M. J. (2017). Pluripotent Nontumorigenic Adipose Tissue-Derived Muse Cells have Immunomodulatory Capacity Mediated by Transforming Growth Factor- β 1. *Stem cells translational medicine*, *6*(1), 161–173.
- [9]: Mao, X., Xu, J., Wang, W., Liang, C., Hua, J., Liu, J., Zhang, B., Meng, Q., Yu, X., & Shi, S. (2021). Crosstalk between cancer-associated fibroblasts and immune cells in the tumor microenvironment: new findings and future perspectives. *Molecular cancer*, *20*(1), 131.
- [10]: Arpinati, L., & Scherz-Shouval, R. (2023). From gatekeepers to providers: regulation of immune functions by cancer-associated fibroblasts. *Trends in cancer*, *9*(5), 421–443.
- [11]: Qiao, Y., Zhang, C., Li, A., Wang, D., Luo, Z., Ping, Y., Zhou, B., Liu, S., Li, H., Yue, D., Zhang, Z., Chen, X., Shen, Z., Lian, J., Li, Y., Wang, S., Li, F., Huang, L., Wang, L., Zhang, B., Zhang, Y. (2018). IL6 derived from cancer-associated fibroblasts promotes chemoresistance via CXCR7 in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncogene*, *37*(7), 873–883.
- [12]: Huang, W. Y., Lin, Y. S., Lin, Y. C., Nieh, S., Chang, Y. M., Lee, T. Y., Chen, S. F., & Yang, K. D. (2022). Cancer-Associated Fibroblasts Promote Tumor Aggressiveness in Head and Neck Cancer through Chemokine Ligand 11 and C-C Motif Chemokine Receptor 3 Signaling Circuit. *Cancers*, *14*(13), 3141.
- [13]: Miki, Y., Yashiro, M., Okuno, T., Kitayama, K., Masuda, G., Hirakawa, K., & Ohira, M. (2018). CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhous-type gastric cancer cells. *British journal of cancer*, *118*(6), 867–877.
- [14]: Kay, E. J., Paterson, K., Riera-Domingo, C., Sumpton, D., Däbritz, J. H. M., Tardito, S., Boldrini, C., Hernandez-Fernaund, J. R., Athineos, D., Dhayade, S., Stepanova, E., Gjerga, E., Neilson, L. J., Lilla, S., Hedley, A., Koulouras, G., McGregor, G., Jamieson, C., Johnson, R. M., Park, M., ... Zanivan, S. (2022). Cancer-associated fibroblasts require proline synthesis by PYCR1 for the deposition of pro-tumorigenic extracellular matrix. *Nature metabolism*, *4*(6), 693–710.
- [15]: Lv, C., Dai, H., Sun, M., Zhao, H., Wu, K., Zhu, J., Wang, Y., Cao, X., Xia, Z., & Xue, C. (2017). Mesenchymal stem cells induce epithelial mesenchymal transition in melanoma by paracrine secretion of transforming growth factor- β . *Melanoma research*, *27*(2), 74–84.
- [16]: Manoukian, P., Bijlsma, M., & van Laarhoven, H. (2021). The Cellular Origins of Cancer-Associated Fibroblasts and Their Opposing Contributions to Pancreatic Cancer Growth. *Frontiers in cell and developmental biology*, *9*, 743907.

- [17]: Hutchins, D., & Steel, C. M. (1994). Regulation of ICAM-1 (CD54) expression in human breast cancer cell lines by interleukin 6 and fibroblast-derived factors. *International journal of cancer*, *58*(1), 80–84.
- [18]: Miki, Y., Yashiro, M., Okuno, T., Kitayama, K., Masuda, G., Hirakawa, K., & Ohira, M. (2018). CD9-positive exosomes from cancer-associated fibroblasts stimulate the migration ability of scirrhous-type gastric cancer cells. *British journal of cancer*, *118*(6), 867–877.
- [19]: Pan, J., Ma, Z., Liu, B., Qian, H., Shao, X., Liu, J., Wang, Q., & Xue, W. (2023). Identification of cancer-associated fibroblasts subtypes in prostate cancer. *Frontiers in immunology*, *14*, 1133160.
- [20]: Gu, L., Liao, P., & Liu, H. (2022). Cancer-associated fibroblasts in acute leukemia. *Frontiers in oncology*, *12*, 1022979.
- [21]: Jamal, S. M. E., Alamodi, A., Wahl, R. U., Grada, Z., Shareef, M. A., Hassan, S. Y., Murad, F., Hassan, S. L., Santourlidis, S., Gomez, C. R., Haikel, Y., Megahed, M., & Hassan, M. (2020). Melanoma stem cell maintenance and chemo-resistance are mediated by CD133 signal to PI3K-dependent pathways. *Oncogene*, *39*(32), 5468–5478.
- [22]: Tejera-Vaquero, A., Nagore, E., Meléndez, J. J., López-Navarro, N., Martorell-Calatayud, A., Herrera-Acosta, E., Traves, V., Guillén, C., & Herrera-Ceballos, E. (2012). Chronology of metastasis in cutaneous melanoma: growth rate model. *The Journal of investigative dermatology*, *132*(4), 1215–1221.
- [23]: Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J. P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., Winckler, W., ... Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, *150*(2), 251–263.
- [24]: Plaks, V., Kong, N., & Werb, Z. (2015). The cancer stem cell niche: how essential is the niche in regulating stemness of tumor cells? *Cell stem cell*, *16*(3), 225–238.
- [25]: Yamauchi, T., Kuroda, Y., Morita, T., Shichinohe, H., Houkin, K., Dezawa, M., & Kuroda, S. (2015). Therapeutic effects of human multilineage-differentiating stress enduring (MUSE) cell transplantation into infarct brain of mice. *PloS one*, *10*(3), e0116009.
- [26]: Tsuchiyama, K., Wakao, S., Kuroda, Y., Ogura, F., Nojima, M., Sawaya, N., Yamasaki, K., Aiba, S., & Dezawa, M. (2013). Functional melanocytes are readily reprogrammable from multilineage-differentiating stress-enduring (muse) cells, distinct stem cells in human fibroblasts. *The Journal of investigative dermatology*, *133*(10), 2425–2435.
- [27]: Gimeno, M. L., Fuertes, F., Barcala Tabarozzi, A. E., Attorressi, A. I., Cucchiani, R., Corrales, L., Oliveira, T. C., Sogayar, M. C., Labriola, L., Dewey, R. A., & Perone, M. J. (2017). Pluripotent Nontumorigenic Adipose Tissue-Derived Muse Cells have Immunomodulatory Capacity Mediated by Transforming Growth Factor- β 1. *Stem cells translational medicine*, *6*(1), 161–173.
- [28]: Yamauchi, T., Yamasaki, K., Tsuchiyama, K., Koike, S., & Aiba, S. (2017). A quantitative analysis of multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells in human adipose

tissue and efficacy of melanocytes induction. *Journal of dermatological science*, 86(3), 198–205

[29]: Mallana, S. K., & Duncan, S. A. (2013). Differentiation of hepatocytes from pluripotent stem cells. *Current protocols in stem cell biology*, 26, 1G.4.1–1G.4.13.

[30]: Wakao, S., Kitada, M., Kuroda, Y., Shigemoto, T., Matsuse, D., Akashi, H., Tanimura, Y., Tsuchiyama, K., Kikuchi, T., Goda, M., Nakahata, T., Fujiyoshi, Y., & Dezawa, M. (2011). Multilineage-differentiating stress-enduring (Muse) cells are a primary source of induced pluripotent stem cells in human fibroblasts. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(24), 9875–9880.

[31]: Li L, Fukunaga-Kalabis M, Yu H, Xu X, Kong J, Lee JT, Herlyn M. Human dermal stem cells differentiate into functional epidermal melanocytes. *J Cell Sci*. 2010 Mar 15;123(Pt 6):853-60.

[32]: Zhou, Q., Jin, X., Zhao, Y., Wang, Y., Tao, M., Cao, Y., & Yin, X. (2024). Melanoma-associated fibroblasts in tumor-promotion inflammation and antitumor immunity: novel mechanisms and potential immunotherapeutic strategies. *Human molecular genetics*, 33(13), 1186–1193.

[33]: Beug H. (2009). Breast cancer stem cells: eradication by differentiation therapy? *Cell*, 138(4), 623–625.

[34]: Leñero, C., Kaplan, L. D., Best, T. M., & Kouroupis, D. (2022). CD146+ Endometrial-Derived Mesenchymal Stem/Stromal Cell Subpopulation Possesses Exosomal Secretomes with Strong Immunomodulatory miRNA Attributes. *Cells*, 11(24), 4002.

[35]: Smith, R. J. P., Faroni, A., Barrow, J. R., Soul, J., & Reid, A. J. (2021). The angiogenic potential of CD271+ human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem cell research & therapy*, 12(1), 160.

8. Bibliográfia

A Téziseket Alátámasztó Publikációk Listája:

Elsőszerzős publikáció

[I]: Szeky, B., Mayer, B., Gyongy, M., Hajdara, A., Barsi, S., Karpati, S., & Nemeth, K. (2021). Tri-Lineage Differentiation of NTERA2 Clone D1 Cells towards Neural, Hepatic and Osteogenic Lineages in Vitro. *FOLIA BIOLOGICA*, 67(5–6), 174–182.

Megosztott Elsőszerzős publikáció

[II]: Çakır, U., Hajdara, A., Székely, B., Mayer, B., Kárpáti, S., Mezey, É., ... Németh, K. (2021). Mesenchymal-Stromal Cell-like Melanoma-Associated Fibroblasts Increase IL-10 Production by Macrophages in a Cyclooxygenase/Indoleamine 2,3-Dioxygenase-Dependent Manner. *CANCERS*, 13(24).

A tézisekhez kapcsolódó publikáció:

Hajdara, A., Çakır, U., Érsek, B., Silló, P., Székely, B., Barna, G., ... Mayer, B. (2023). Targeting Melanoma-Associated Fibroblasts (MAFs) with Activated $\gamma\delta$ (V δ 2) T Cells: An In Vitro Cytotoxicity Model. *INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR SCIENCES*, 24(16), 12893.

Egyéb Publikációk

Székely, B. (2018). The Role of Extracellular Matrix Remodeling Enzymes in Dermal Stem Cell Function. *PHD PROCEEDINGS ANNUAL ISSUES OF THE DOCTORAL SCHOOL FACULTY OF INFORMATION TECHNOLOGY AND BIONICS*, 13, 71.

Székely, B. (2017). Investigating Molecular Markers and Regulators of Dermal Stem Cell Function. *PHD PROCEEDINGS ANNUAL ISSUES OF THE DOCTORAL SCHOOL FACULTY OF INFORMATION TECHNOLOGY AND BIONICS*, 12, 34–34.

Balázs, S. (2016). Examination of dermal stem cells in healthy and diseased skin. *PHD PROCEEDINGS ANNUAL ISSUES OF THE DOCTORAL SCHOOL FACULTY OF INFORMATION TECHNOLOGY AND BIONICS*, 11, 97–100.

Szeky, B., Sillo, P., Fabian, M., Mayer, B., Karpati, S., & Nemeth, K. (2016). Tumorössejtek szerepe a melanoma progressziójában és heterogenitásában. *ORVOSI HETILAP*, 157(34), 1339–1348.