

## 1. Vérbőző őssejtek

Egy őssejtnek genetikai elkötelezettségétől, szöveti környezetétől, érettségétől, korától, stb. függően sokféle és gyorsan változó arca lehet. Mindegyik arc „valódi” egy adott pillanatban, de – éppen a folyamatos változás miatt – számunkra sokszor nehezen felismerhető, illetve megfogható. Munkánk első részében 6-8 hetes (C57Bl x DBA/2)F1 egerek haematopoeticus őssejtjeinek (HSC) a heterogenitását vizsgáltuk. Az állatok csőves csontjaiból (femur és tibia) kifujt sejtuszupenzióból izoláltuk a tenyésztőedények műanyag felületéhez nem tapadó (Na) és a különböző vérsajtfejlődési sorokra jellemző antigéneket (CD3, CD45R/B220, CD11b, Ly-6G, TER-119) nem hordozó (Lin<sup>-</sup>) fehérvérsajtjeiket. A továbbiakban ezeket – az összes csontvelői magvas sejt 0,5-0,8%-át kitevő - Na, Lin<sup>-</sup> sejteket jellemeztük felszíni markereik (áramlási cytometria), *in vitro* proliferációs képességük (kolóniaképzés lágy gélben és „macskakő” kultúrában), valamint *in vivo* repopulációs képességük alapján.

Megállapítottuk, hogy az Na, Lin<sup>-</sup> sejtek közel fele (40-45%-a) nem őssejt, hanem Sca<sup>-</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> és MHC-I<sup>+</sup> fenotípusú, lágy gélben haematopoeticus növekedési faktorok (WEHI-3B kondicionált felülúszó) jelenlétében kolóniát képző, korai, de már elkötelezett elődsejt. A Na, Lin<sup>-</sup> populáció további 20-25%-át az általunk HSC2-esnek nevezett, Sca<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD34<sup>+</sup> és MHC-I<sup>+</sup> fenotípusú, lágy gélben nem, de „macskakő” kultúrában 21 és 35 nap után kolóniát képző – „klasszikusnak” mondható – haematopoeticus őssejtek teszik ki. Ugyanakkor - az irodalmi adatokkal összhangban - igazoltuk egy korábbi (HSC1), Sca<sup>+</sup>, c-kit<sup>+</sup>, CD34<sup>-</sup> és MHC-I<sup>+</sup> fenotípusú, „macskakő” kultúrában 35 nap után részben kimutatható, de elsősorban a tartós *in vivo* repopulációban résztvevő őssejt szubpopuláció létezését is. Végül ideiglenesen HSC0-nak neveztük el azt az Sca<sup>+</sup>, c-kit<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> és MHC-I<sup>+</sup> fenotípusú sejtekből álló szubpopulációt, amelyről – a sejtek Sca pozitivitása alapján – feltételezzük, hogy a legfiatalabb haematopoeticus őssejtet tartalmazza. Valószínűnek tartjuk, hogy ezek és/vagy a semmilyen általunk vizsgált felszíni markert nem hordozó Na, Lin<sup>-</sup> csontvelői sejtek felelősek a haematopoeticus őssejtek *in vivo* megfigyelhető plaszticitásáért.

## 2. Mesenchymalis őssejtek

A mesenchymalis őssejtet (MSC) bizvást nevezhetjük a szervezet Janus-arcú szöveti őssejtjeiknek. Becslések szerint 1:10<sup>5</sup> – 1:10<sup>6</sup> gyakorisággal fordulnak elő a csontvelőben, de nem ismerünk olyan specifikus markert vagy marker kombinációt, amivel akár *in vivo*, akár *in vitro* azonosítani lehetne őket. Izolálásuk lényegében adherenciájukon alapul. A csontvelőből kitapasztott stroma sejteket, miután benőtték a rendelkezésükre álló felületet, felszedjük és kis sejtsűrűség mellett átoltjuk. Többszöri átoltás után egy jórészt fibroblast-szerű sejtekből álló, exponenciálisan növekedő tenyészetet kapunk, amit – ha már nem tartalmaz vérbőző sejteket - MSC kultúrának tekinthetünk. Emberi csontvelőből kiindulva általában már három, egér csontvelő esetén hat-nyolc átoltás után érjük el ezt az állapotot. Az ilyen sejtek egységesen CD133, CD34, és CD45 (ember), illetve CD34, CD3, CD45/B220, CD11b, Ly-6G, és TER-119 (egér) negatívak. Lágy gél kultúrában haematopoieticus növekedési faktorok jelenlétében sem képeznek kolóniát. Visszajuttatva őket a szervezetbe nem vándorolnak a csontvelőbe (minden csontvelő-transzplantált beteg és kísérleti állat stromája recipiens eredetű), hanem inkább szétszóródnak a különböző szövetekben.

Ugyanakkor *in vitro* kultúrában ezek a legplasztikusabb szöveti őssejtek. Mesodermalis (vérbőzést támogató stroma, csont, porc, zsírszövet, inak, simaizom), ectodermalis (neuron, glia) és endodermalis (májsejtek, inzulintermelő β-sejtek) irányba egyaránt képesek differenciálódni. Plaszticitásuk azonban – ellentétben az embrionális őssejtekével – idővel fokozatosan csökken. Megállapítottuk, hogy először neuronális irányú differenciálódási képességüket veszítik el (emberi MSC-k esetén 6-8 átoltás után), majd egyre nehezebben alakítanak ki vérbőzést támogató stromát. Az öregedés következő fázisában már

nem, vagy csak alig differenciálódnak zsírsejteké izobutil-metilxanthin hatására. Legtovább, gyakorlatilag a kultúrák teljes előregedéséig (25-30 átoltás), osteoblastokká képesek alakulni. Ha az MSC-k, és ennek következtében a stroma – pontosabban a vérképző őssejt niche - öregedése felgyorsul, megnő az esélye annak, hogy egy-egy beteg vérképző klón elszaporodjon a csontvelőben. Amikor például myelodysplasiás (MDS) és myelomás (MM) betegek csontvelő mintáiból izolált MSC-k tenyésztését hasonlítottuk össze egészséges csontvelő donorokéval, megállapítottuk, hogy a myelomás betegekből származó stroma tenyészetek, az egészséges emberek MSC-iből kialakított stroma rétegekhez hasonlóan jól növekednek *in vitro*, érett állapotban konfluensek és minden irányba jól differenciálódnak. Ezzel szemben a myelodysplasiás strómák morfológiailag kevésbé egységes képet mutatnak, lassabban növekednek, erősen apoptotikusak és általában nem érik el a konfluenciát. Neuronális irányba egyáltalán nem képesek differenciálódni és jelentős mennyiségű adipocita keletkezését is csak néhány MDS beteg stromájában sikerült indukálni. Vérképzést támogató képességük gyakran szintén rosszabb mint az egészséges emberek vagy MM-es betegek csontvelőjéből kialakított stroma rétegeké. MM-ben tehát egy olyan kölcsönös paracrin kapcsolatot van a neoplasztikus plazmasejtek (a tumor) és a stroma között, amely a betegség progresszióját elősegítő, de korántsem visszafordíthatatlan változásokat indukál az egyébként egészséges csontvelői mikro környezetben. Ugyanakkor MDS-ben valószínűleg a stroma betegsége az elsődleges, annak akcelerált öregedése teszi lehetővé egy beteg vérképző klón „elszabadulását”.

### 3. Őssejt plaszticitás

A csontvelői őssejtek plaszticitását főként transzplantációs kísérletek igazolták. Állatmodellekben és csontvelő-transzplantáció után elhunyt betegek szövetmintáiban a beültetett őssejtek sorsa nyomon követhető és megállapítható, hogy a donor eredetű őssejtek számos szervben – többek között a központi idegrendszerben is - megtelepednek, majd az adott szöveti környezetnek megfelelő érett sejtekké differenciálódnak. A szinte végtelennek tűnő szöveti őssejt plaszticitás klinikai felhasználásához azonban az eddig megfigyeltnél sokkal nagyobb mértékű graft- beépülésre és az őssejtek fejlődésének ellenőrzött irányítására lenne szükség. Hasznos lehetne például ha az őssejtek érését már a beültetés előtt - *in vitro* kultúrában – el tudnánk indítani a megfelelő sejtfajlódási sor irányába. Ezért számos munkacsoport dolgozott ki a mesenchymalis őssejtek (MSC) neuronális irányú differenciáltatására alkalmas módszert. Közülük a legegyszerűbb a Woodbury és mtsai (J Neurosci Res 61: 364, 2000) által leírt sejtenyésztés, amelynek lényege, hogy az MSC-eket szérummentes tápfolyadékban, nagy mennyiségű 2-merkaptóetanol (2-ME) jelenlétében inkubálják. Ilyenkor az MSC-k jelentős morfológiai változásokon mennek keresztül és néhány, idegsejtekre jellemző fehérjét expresszálnak. Ugyanakkor a legtöbb kritika is ezt a módszert érte. Felvetődött, hogy az erős redukálószer stresszt okoz, aminek következtében jelentős átrendeződés történik a citoskeletonban, megváltozik a sejtek alakja és néhány neuronális fehérjére specifikus ellenanyag egyszerűen keresztreagál a károsodott sejtekkel. Munkánkban azt szeretnénk vizsgálni, hogy mi is történik az ilyen sejtenyésztésekben? Megállapítottuk, hogy szérummentes DMEM médiumban - 2,5 mM 2-ME jelenlétében - az emberi MSC-k 40-70%-a valóban a tipikus idegsejtekre emlékeztető alakot (morfológiát) vesz fel. A korábban lapos, szétterülő sejtek lekerekednek és összehúzódnak miközben hosszú, axon- és dendritszerű nyúlványokat képeznek. A hosszabb nyúlványok (axonok?) végén jól látható kúp van. Néhány óra múlva Nissl-rögök is megjelennek az átalakuló sejtekben. Két-három nap múlva a sejtek citoplazmájában neuron specifikus enoláz (NSE), sejtmagjukban pedig neuron specifikus nukleáris fehérje (NeuN) mutatható ki indirekt immunfluoreszcens módszerrel. (GFAP pozitív sejteket egyetlen 2-ME-al kezelt MSC kultúrákban sem találtunk). Western blot technikával a kezeletlen MSC-kben csak nestint tudtunk kimutatni, ami a sejtek

differentiálódása során fokozatosan eltűnik a citoplazmából, miközben egyre több NSE és neurofilament-H (NF-H) expresszálódik. Mivel az immunfluoreszcens vizsgálatokat a Chemicon, a Western blottokat a Santa Cruz Biotechnology ellenanyagaival végeztük (tehát összesen hat különböző ellenanyag felhasználásával dolgoztunk), ez megerősíti azt a feltevést, hogy a 2-MA-al kezelt MSC-kben idegsejtekre jellemző fehérjék jelennek meg. Ráadásul, ha a redukálószer mellett Jagged-1 fehérjét is adunk a tenyészetekhez, „dendrit-virágzás” figyelhető meg, azaz a sejtek több, jobban elágazó, de rövidebb nyúlványt hoznak létre, mint a Jagged-1-et nem tartalmazó kultúrákban. A dendrit-virágzást az NF-H fokozott intracelluláris expressziója kíséri. Elmondhatjuk tehát, hogy az MSC-kből - szérumentes tápfolyadékban - 2-ME hatására a neuronokra jellemző fehérjéket expresszáló és a külső szignál(ok)ra (Jagged-1) reagáló, élő sejtek keletkeznek. Természetesen további – elsősorban elektrofiziológiai – vizsgálatokra van szükség annak eldöntéséhez, hogy ezeket az MSC eredetű sejteket valódi neuronoknak tekinthetjük-e?

A betegség vagy sérülés következtében károsodott ízületi porc az érellátás hiánya és a porcsejtek rendkívül kis fajlagos mennyisége miatt alig, vagy egyáltalán nem képes regenerálódni. Ezért rendkívül nagy az érdeklődés minden olyan módszer iránt, amely alkalmas lehet a szervezetbe beültethető porcszövet (vagy teljes ízületi protézis) *in vitro* előállítására, esetleg a sérült porcterület *in situ* pótlására. A csontvelői stromából izolálható mesenchymalis őssejtek (MSC) különösen ígéretes kiindulási anyagot jelentenek e próbálkozások során. Az MSC-k olyan multipotens sejtek, amelyek bármilyen kötő- és támasztószövet valamint a vérképzést támogató stroma irányába egyaránt képesek differenciálódni. Munkánkban egy, a csontvelői stromából izolált MSC-k porc irányú differenciálódásának vizsgálatára alkalmas, 96-lyukú tenyésztőtálcán kivitelezhető mikromódszert fejlesztettünk ki. A csontvelőmintákat csípőprotézis műtéten átesett betegek eltávolított combfejből nyertük. A csontvelői adherens sejteket 10-20 generáción keresztül sorozatos átoltással tartottuk fenn. A szuszpenzióba vitt MSC-ket U-aljú tenyésztőtálcákon szélesztettük ( $2 \times 10^5$  sejt/lyuk), centrifugáltuk (micromass pellet), majd 14 napig inkubáltuk őket 10% foetalis borjúsavót (FCS), 5ng/ml rekombináns TGF- $\beta$ 3-at, 6 $\mu$ g/ml inzulint és  $10^{-7}$  M dexamethazont, vagy 10% FCS-t és demineralizált csont-mátrixot (DBM), illetve 10% FCS-t, rekombináns növekedési faktorokat és DBM-et egyaránt tartalmazó DMEM/F12 médiumban. Az egyes lyukak fenekén kialakult miniatűr szövetkorongok összetételét fény és elektronmikroszkópos módszerekkel, valamint izotópos jelölés segítségével tanulmányoztuk. A chondrogenesis során szintetizálódott szulfatált glükózamino-glikánokat 0,1%-os dimetil-metilénkék festéssel tettük láthatóvá (metakromázia). Az I-es és II-es típusú kollagén jelenlétét indirekt immuncitokémia módszerrel igazoltuk a mintákban. A fehérjeszintézis mértékét a kultúrák  $^3$ H-leucin felvétele, a kén beépülését  $^{35}$ S tartalmú szulfáttal felvételük alapján határoztuk meg. Megállapítottuk, hogy a chondrogenesis TGF- $\beta$ 3, inzulin és dexamethazon, vagy DBM, illetve a növekedési faktorok és DBM egyidejű jelenlétében is megindul. Utóbbi – kombinált kezelés - esetében azonban a differenciálódás sokkal markánsabb, mint a csak növekedési faktorokkal és dexamethazonnal, vagy csak DBM-el kezelt kultúrákban. A TGF- $\beta$ 3, inzulin, dexamethazon és DBM egyidejű jelenlétében képződött szövetkorongok kevés lekerekedett sejtből és nagy mennyiségű – proteoglikánokat és II-es típusú kollagént (is) tartalmazó - extracelluláris mátrixból állnak.  $^3$ H-leucin és normalizált szulfát-felvételük is magasabb, mint a csak növekedési faktorokkal vagy csak DBM-el kezelt mintáké. Utóbbiak több sejtet és kevesebb extracelluláris mátrixot tartalmaznak a kéthetes inkubálás után. A DBM tehát biológiailag aktív formában tartalmazza mindazokat a morfogéneket és növekedési faktorokat amelyek az MSC-k chondrocyta irányú differenciálódásához szükségesek. Ráadásul a DBM lassan degradálódik és nem immunogén *in vivo*. Ezért feltételezzük, hogy az MSC/DBM kompozit olyan önálló egységet alkot, amely – különösen TGF- $\beta$ 3-al és inzulinnal előkezelve - a szervezetbe juttatva képes a

legkülönbözőbb porckárosodások kockázat és mellékhatások nélküli "kijavítására", vagyis közvetlenül a klinikai gyakorlatban is felhasználható. Végül legalább ilyen fontos, hogy a protézis műtétek során nyerhető csontvelő minták alkalmasak lehetnek egy emberi MSC bank létrehozására.

#### 4. Az őssejt „niche”

A vérképző őssejtek csontvelői mikrokönyezete – a haematopoeticus őssejt *niche* - valószínűleg az egyik legösszetettebb szövetünk. Az őssejteket különböző stroma sejtek (fibroblasztok, adipocyták, macrophagok, reticularis sejtek, stb.), fejlődő vörsejtek, valamint gazdag sejt-közötti állomány, extracelluláris mátrix veszi körül. A stroma sejtek részben közvetlen sejt-sejt kölcsönhatások, részben az általuk termelt szolubilis és/vagy az extracelluláris mátrixhoz kötött citokinek (SCF, Flt-3, IL-3, IL-6, IL-7), kemokinek (SDF-1) és morfogének (TGF- $\beta$ 1, BMP2/4, Wnt fehérjék) segítségével befolyásolják (vagy inkább irányítják?) az őssejtek sorsát. Ráadásul a különböző típusú stroma sejteket – sőt a stroma és az őssejteket is – az 1 kD-nál kisebb hírvivő molekulák ( $Ca^{++}$  ionok, cAMP, ATP, és aminosavak) gyors továbbítására alkalmas réskapcsolatok százai kötik össze.

A Notch egy filogenetikailag ősi, a soksejtű szervezetek differenciálódása során nélkülözhetetlen sejt-sejt kölcsönhatásokat biztosító és az érintett sejtek további sorsát meghatározó jeltovábbító rendszer. Emberben négy receptorból (Notch1, 2, 3, 4) és legalább hat ligandumból (Jagged1, 2 és Delta(-like)1, 2, 3, 4) áll. Kulcsszerepe van a genomban tárolt fejlődési program(ok) kifejeződésében, a különböző szervek és szövetek kialakulásának szabályozásában. Felmerült, hogy a vérképző ő- és elődsejt kompartmentben is (legalábbis részben) a Notch-rendszer biztosítja az önfenntartó osztódás(ok) és a differenciálódás megfelelő egyensúlyát, azaz a folyamatos vérképzés fenntartását. Az erre vonatkozó adatok azonban meglehetősen ellentmondásosak. Munkánkban ezért a csontvelői stroma sejtek felszínén legnagyobb mennyiségben expresszálódó Notch-ligandum – a Jagged1 fehérje – szolubilis (monovalens) és Sepharose-4B szemcsék felületéhez kötött (multivalens) formájának az egér haematopoeticus ő- és elődsejtek fejlődésére gyakorolt hatását szeretnénk volna tisztázni.

A Jagged1 fehérje extracelluláris doménjét (JG1<sup>ECD</sup>) kódoló cDNS-t tartalmazó pUSEamp(+) plazmidot *E. coli*-ban felszaporítottuk, izoláltuk a vektort, majd LipofectAmine Plus<sup>TM</sup> reagens segítségével COS-7 sejtekbe jutattuk. A sikeresen transzfektált - neomycin rezisztens - COS-7 sejtek felülúszójából kecskében termelt anti-Jagged1 ellenanyaggal fedett affinitás oszlopon izoláltuk a rekombináns JG1<sup>ECD</sup> fehérjét, amelynek egy részét BrCN-al aktivált Sepharose-4B szemcsékhez kötöttük. Csontvelői magvas sejteket, valamint az ezek néhány tized százalékát kitevő Lin<sup>-</sup>, azaz egyik vörsejtfejlődési sorra jellemző markereket sem hordozó fiatal sejteket 6-8 hetes (C57Bl/6xDBA/2)F1 egerek csöves csontjaiból a laboratóriumunkban korábban leírt módszerrel izoláltunk. A mono- és multivalens JG1<sup>ECD</sup> ligandumoknak a csontvelői sejtekre gyakorolt hatását különböző típusú *in vitro* kultúrákban tanulmányoztuk.

Megállapítottuk, hogy a különböző vörsejtfejlődési sorok irányába elkötelezett, lágy gélben kolóniát képző elődsejtek (CFU-GM, BFU-E, CFU-GEMM) osztódását a szolubilis és az inszolubilizált JG1<sup>ECD</sup> - más növekedési faktorok (IL-3 és CSF-ek) egyidejű jelenlétében – fokozza. A stroma-függő „macskakő kultúrákban” 7-14 nap után kolóniát képző sejtek (CAFC) aránya szintén megnő 5-10  $\mu$ g/ml JG1<sup>ECD</sup> jelenlétében. Ugyanakkor a legfiatalabb vérképző sejtek (28-35 napos CAFC) kolóniaképzését hasonló mennyiségű szolubilis JG1<sup>ECD</sup> gátolja. Ha Lin<sup>-</sup> sejteket inkubálunk őssejt-faktor (SCF), Flt3-ligandum (Flt3L), trombopoetin (TPO) és szolubilis vagy inszolubilizált JG1<sup>ECD</sup>-t tartalmazó szuszpenziós kultúrákban, két hét után a JG1<sup>ECD</sup>-Sepharose-4B-t tartalmazó tenyészetekben közel egy nagyságrenddel több

fiatal - „macskakő kultúrában” csak 35 nap után kolóniát képző sejt – található mint a három növekedési faktort és szolubilis JG1<sup>ECD</sup>-t, vagy csak a növekedési faktorokat tartalmazó tenyészetekben. (Utóbbiakban az őssejtek száma nem változik két hét alatt).

A multivalens, inszolubilizált Jagged1 tehát stromasejteket vagy korai növekedési faktorokat (SCF-et, Flt3L-t és TPO-t) tartalmazó *in vitro* tenyészetekben képes sorozatos önfenntartó osztódásra készíteni a vérképző őssejteket, azaz segít megnövelni az őssejt kompartment méretét anélkül, hogy közben romlana a sejtek „minősége”. Szolubilis JG1<sup>ECD</sup> egyidejű jelenléte a kultúrákban ezt gátolja. Ugyanakkor a már valamely sejtfejlődési sor irányába elkötelezett elődsejtek számára a Jagged1 mono- és multivalens formában egyaránt egy nem túl hatékony növekedési faktor.

A csontvelői stroma sejtek által (is) termelt kis molekulású lektin, a galektin-1 (Gal-1) különböző korú vérképző ő- és elődsejtekre gyakorolt hatását szintén tanulmányoztuk. Csontvelői magvas sejteket, valamint az ezek néhány tized százalékát kitevő Lin<sup>-</sup>, azaz egyik vérsajtfejlődési sorra jellemző markereket (CD3, CD45R/B220, CD11b, Ly-6G, TER-119) sem hordozó fiatal sejteket 6-8 hetes (C57Bl/6xDBA/2)F1 egerek csöves csontjaiból (femur, tibia) a laboratóriumunkban korábban leírt módszerrel izoláltunk. A Gal-1 sejt felszíni kötődését és/vagy intracelluláris megjelenését áramlási cytometriával mértük. A granulocytá-macrophag (CFU-GM) és erythrocyta (BFU-E= burst forming unit-erythroid) irányba elkötelezett kolóniaképző elődsejteket lágy gél kultúrában tenyésztettük. A vérképző ő- és elődsejt kompartment(ek) teljes korstruktúráját preformált stromarétegen végzett limitált hígítás, un. „macskakő kultúra” (CAFC=cobblestone area-forming cells) segítségével határoztuk meg.

Megállapítottuk, hogy a csontvelői magvas sejtek 70-75%-a és a Lin<sup>-</sup> sejtek több mint 95%-a képes rekombináns Gal-1-et kötni. Intracelluláris Gal-1-et azonban csak a magvas sejtek 40-45%-ában – elsősorban az adherens sejtekben - találtunk. Magas (5-10 µg/ml-es) koncentrációjú Gal-1 minden csontvelői sejtet elpusztít, a különböző korú vérképző sejtek Gal-1 érzékenysége között azonban szignifikáns különbség van. A legérettebb (7 napos CAFC és lágy gélben kolóniát képző sejtek) a legérzékenyebbek, míg a legfiatalabb (35 napos CAFC) haematopoeticus sejtek a legellenállóbbak a Gal-1-indukált apoptózissal szemben. Ugyanakkor alacsony (10-100 ng/ml) koncentrációjú Gal-1 fokozza az elkötelezett elődsejtek kolóniaképzését (CFU-GM, BFU-E, 7 napos CAFC) és - egyidejűleg - csökkenti a 21 napos (az átmeneti haematopoeticus repopulációra képes sejteknek megfelelő) „macskakő-képző” sejtek gyakoriságát. Az *in vivo* tartós haematopoeticus repopulációt biztosító őssejtekhez legközelebb álló, azaz legfiatalabb (35 napos CAFC) vérképző sejtek gyakoriságát azonban a kis mennyiségű Gal-1 nem befolyásolja.

A Gal-1 tehát többféle mechanizmus – apoptózis kiváltása, proliferáció fokozás és/vagy gátlás, differenciálódás elindítása - segítségével képes befolyásolni a vérképző ő- és elődsejtek aktuális korstruktúráját, a különböző korú és érettségű sejtekből álló kompartmentek relatív méretét. Eredményeink nagyban hozzájárulhatnak annak megértéséhez, hogy miért olyan hatékony immunszuppresszív és gyulladásgátló anyag a Gal-1 *in vivo*.

Mivel a csontvelői stroma sejtek felszínén, a vérképző sejtekkel ellentétben, nagy mennyiségű gal-1 mutatható ki, felvetődött a kérdés: képes-e a gal-1 befolyásolni a haematopoeticus sejtek és mikrokozonyezetük kölcsönhatását, azaz a véképző őssejt niche működését *in vivo*? Megállapítottuk, hogy a gal-1 már igen kis mennyiségben (125-250 µg/testsúly kg) hatékonyan gátolja a (C57BlxDBA/2)F1 egerek vérképző ő- és elődsejtjeinek, valamint granulocytáinak ciklofoszfamiddal (CY) és granulocytá kolóniai-stimuláló faktorról (G-CSF) indukált mobilizációját. A rekombináns fehérje megakadályozza a tartós *in vivo* repopulációra képes őssejtek, a granulocytá-macrophag fejlődési irányba

elkötelezett (kolónia-képző) elődsejtek és az érett granulocyták megjelenését a CY-al és G-CSF-el kezelt állatok keringésében. Ugyanakkor a citosztatikummal és kolónia-stimuláló faktorról oltott egerek csontvelőjében a gal-1 adása sem a magvas sejtek számában, sem a kolónia-képző sejtek gyakoriságában nem okoz szignifikáns változást. Ráadásul az Sca-1<sup>+</sup> (haematopoeticus őse- és progenitor) sejtek, valamint az érett granulocyták (Ly-6A<sup>+</sup> sejtek) és monocyták (CD11b<sup>+</sup> sejtek) aránya gal-1 hatására kifejezetten megnőtt a CY-al és G-CSF-el kezelt állatok csontvelő mintáiban. A gal-1 tehát – legalábbis az általunk vizsgált koncentráció tartományban – nem csökkenti a vértképző sejtek osztódását és differenciálódását a csontvelőben és nem is öli meg őket, mobilizációjukat viszont gátolja. Ez – legalábbis részben – magyarázatot adhat arra, miért képes a gal-1 hatékonyan gátolni a különböző gyulladásos és autoimmun folyamatokat *in vivo*.