

Doktori Ph.D. Értekezés Tézisei

A Wnt jelátvitel szerepe a thymus öregedésében

Varecza Zoltán

PhD témavezető: Dr. Judit E. Pongrácz

PhD Programvezető: Prof. Dr. Péter Németh

Pécsi Tudományegyetem

Immunológiai és Biotechnológiai Intézet

Orvosi Biotechnológia Tanszék

Pécs

2011

1. Bevezetés

Középpontban az öregedés

A társadalom öregedése

A következő 50 év egyik legnagyobb kihívása a fejlett világ számára, szembenézni a populáció öregedésével. A jelenlegi demografikus mutatók szerint az öregedésből fakadó aktív munkaerő csökkenése hatalmas nyomást gyakorol a szociális biztonságra és egészségügyi rendszer finanszírozására, ami előre láthatólag az életszínvonal csökkenésével fog járni.

Az immunrendszer öregedése

Idős korban az immunológiai válaszreakciók romlása a hatékony immunizálás elérésének fontos problémája. Az egyén immunológiai kompetenciáját az elsődleges immunszervekben keletkező érett limfociták illetve a specializált, klünböző immunválaszokban résztvevő másodlagos limfoid szövetek jelenléte határozza meg. Következésképpen a limfoid mikro környezetben bekövetkező bármilyen károsodás pl a tímuszban történő T-sejt szelekció csökkenéséhez és végül az elsődleges és másodlagos immunválaszok romlásához vezet, mely többek között az idős korban gyakran megfigyelhető autoimmun betegségek kialakulásában nyilvánul meg. A saját struktúrákkal szemben toleráns citotoxikus és segítő T-limfociták, melyek az adaptív immunválasz elengedhetetlen szabályozó sejtjei, a tímusz specializált epitheliális hálózatában fejlődnek. Ezért, amikor a tímusz fokozatosan elveszíti a limfopoiesis támogató képességét a programozott öregedése során, az a *de novo* T-sejt termelés hanyatlását vonja maga után.

A tímusz visszafejlődés vizsgálatának fontossága

A tímusz stromájának öregedéséért felelős molekuláris mechanizmusok átfogóbb megértése lehetővé tehetné idős korban az immunológiai kompetencia visszaállítását az involúción átesett tímusz epithelium irányított regenerációjával, mely a periférián a T-sejt függő immunválasz-képesség helyreállításához vezethetne.

A tímusz visszafejlődése az öregedés folyamán

A tímusz öregedése, összehasonlítva más szervekkel egy felgyorsult folyamat minden emlősben. Emberek esetében a tímusz öregedése a késői pubertás korban kezdődik és 50 éves korunkra a tímusz stróma állományának 80%-a zsírszövetté alakul. Azt az egész folyamatot mely során a tímusz epitheliumot zsírszövet váltja fel elzsírosodással egybekötött (adipóz) involúciónak nevezzük. A tímusz epitheliális szövetállományának csökkenése miatt nem képes a T-sejt termelés korábbi szintjét fenntartani. Minthogy a tímusz epithelium kulcs szerepet játszik az autoreaktív T-sejt klónok eliminálásában, az itt bekövetkező funkcionális károsodás az autoimmun betegségek kialakulásának esélyét növeli. A tímusz fejlődését befolyásoló egyik transzkripciós faktort a FoxN1-et is befolyásolja az öregedés. A FoxN1 nemcsak az tímusz-csírszak epitheliális progenitor sejtjei számára - melyek specifikus epitheliális sejtekké fejlődnek - elengedhetetlen, hanem a TEC (thymic epithelial cell) identitásának fenntartásához is elengedhetetlen a differenciálódott felnőtt tímuszban. A FoxN1 szintjének csökkenése felnőtt TEC-ekben a tímusz felgyorsult visszafejlődéséhez vezet.

Wnt-ok az öregedésben

Minthogy a Wnt molekulák fontos szabályozói az őssejtek túlélésének és differenciációjának az utóbbi időben kutatások indultak a Wnt család szerepének felderítésére az öregedés során. A legtöbb kutatás megerősítette, hogy a drasztikusan lecsökkent Wnt szintek öregedést indíthatnak be, mivel az alacsony Wnt jelek hatására a szövetspecifikus őssejtek nem osztódnak, és ezért számuk lecsökken. KLOTHO egereken végzett kísérletek eredményei alapján feltételezések születtek arra is, hogy megnövekedett Wnt jelek folyamatos őssejt proliferációt eredményeznek, amely végül kimeríti az őssejt raktárakat felgyorsult öregedést eredményezve.

Wnt-ok a tímuszban

A Wnt molekulák fő forrása a tímuszon belül az epithelium, ahol a Wnt családnak 14 tagját és mind a 10 ismert Wnt receptorát, a 7 transzmembrán domainnel rendelkező Frizzledeket azonosították. Kezdeti kísérletek a T-sejt fejlődés zavarait írták le olyan esetekben, amikor a vagy a Wnt-ok és vagy a szolubilis Fz-ek szintjét módosították. Ezek az eredmények kiemelték a Wnt-jel-továbbítás fontosságát a T-sejt proliferáció és differenciáció során. Annak feltételezése, hogy a T-sejt fejlődést a tímusz epitheliumban megfigyelhető Wnt-jel-továbbítás módosulása indirekt módon is befolyásolható, Pongrácz és munkatársai 2003-ban közzétett

megfigyelései vetették fel először. Ez a munkacsoport mutatta ki azt is, hogy a kanonikus Wnt jelátviteli útvonal a túlélést és differenciációt szabályozva fontos szerepet játszik a timocita fejlődésben. Egy a tímusz epitheliumon végzett vizsgálat szerint a Wnt szignalizációnak egyik fő célgénje a ciklin D1, melynek transzgenikus expressziója az egész epitheliális kompartment növekedéséhez vezet. Ez a megfigyelés azt sugallja, hogy a Wnt jeltovábbítás részt vesz az epitheliális sejtek proliferációjában, mely alátámasztja azt, hogy a tímusz epithelium fejlődését a Wnt-ok szabályozzák. Eddigi jelátvitellel kapcsolatos vizsgálatok kimutatták, hogy a Wnt4 képes aktiválni mind a kanonikus mind a nem-kanonikus útvonalat.

Transzkripciót gátló Wnt jelátvitel

A kanonikus és a nem-kanonikus útvonalak mellett, inhibitorikus Fz jelátvitelt is azonosítottak már. Fz-1 és Fz-6 például képes gátló Wnt jelek továbbítására. Míg a Fz-1 a Wnt jeltovábbítást G-proteinhez kapcsolt módon gátolja, a Fz-6 a Wnt függő gének transzkripcióját a MAPKKK család egyik tagja, a transforming growth factor β -activated kinase 1 (TAK1) és a Nemo-Like kinase (NLK) aktiválásával, a Ca^{++} függő jelátviteli útvonalon keresztül gátolja. Az NLK foszforilálja a TCF-et mely ezután nem képes kötődni a β -catenin-hez, így az aktív transzkripció complex kialakulása gátolt.

PKC-k a tímuszban

A PKC család tagjai a sejtszintű folyamatok széles skáláját szabályozzák köztük a proliferációt, differenciációt és apoptotikus sejthalált is. A katalitikusan aktív PKC-k általában elmozdulnak a citoszolból a sejt- vagy mag- membránok közelébe. Habár a PKC-k-ről leírták, hogy immunsejtek különböző fajtáinál, mint pl az érett T-sejtek és fejlődő timociták esetében is elengedhetetlen szerepet játszanak a jeltovábbításban, a PKC család expressziója és funkciója a tímusz epithéliumban még bizonytalan.

Szteroidok az öregedésben

A természetes szteroidokról ismert, hogy szerepet játszanak az öregedés szabályozásában. Például mind a kémiai mind a sebészi kasztráció bizonyítottan lassítja az öregedést, alátámasztva ezzel, hogy a magas szteroid szintek felgyorsíthatják az öregedés folyamatát. Mégis, a terápiás céllal használt szteroidok öregedésre gyakorolt hatásait még mindig nem ismerjük teljesen. Kísérletek szintén kimutatták, hogy magas GC-szint drámai, apoptózissal összefüggő tímusz visszafejlődést indukál, és nem csak a timocitákra, de a TEC-re is komoly hatással van.

2. Anyagok és módszerek

Antitestek

Western blot analízis

Western blot analízishez nyúl poliklonális, patkány monoklonális elsődleges és számár HRP-vel konjugált másodlagos antitesteket használtunk

Állatok

BALB/c egereket standardizált körülmények között tartottuk, ahol víz és táplálék megfelelő adagolása biztosított volt. Az állatokat 1, 3, 6, 9, 12 és 18 hónapos korukig engedték öregedni.

Sejtkultúrák

Sejtvonalak

TEP1 (tímusz epithélium), 293 és Phoenix (humán vese epithelium) sejtvonalakat DMEM táptalajon növesztettünk 10% FCS, 100 µg penicillin és streptomycin hozzáadásával.

Primer tímusz epithel sejtek

BALB/c egerek tímuszait használtuk a primer szöveteken végzett kísérletekhez. Primer TEC-eket az EpCAM1 sejtfelszíni marker expressziója alapján tisztítottuk anti-EpCAM-FITC antitestet és mágneses sejt szeparátort használva. A tímuszlebenyeket felnőtt BALB/c egerekből izoláltuk 24h, 1 hét, 1, 3, 6, 9, 12 vagy 18 hónap illetve GFP-transzgenikus BALB/c egerekből 1,5 év öregedés után. A GFP-transzgenikus BALB/c egér modellek lentivirális transzgenézissel készültek.

Sejtek és állatok dexamethasone kezelése

A sejtvonalakat DX-al kezeltük 1 µM végkoncentrációban 1 hétig. 4 hetes BALB/c egereket használtunk a kísérletekhez. Az állatok egyszeri (20mg/kg) dexamethason injekciót kaptak intraperitoneálisan majd 24 illetve 168 óra elteltével terminálásra kerültek vagy alacsony dózisú DX illetve PBS kezelést kaptak folyamatosan 3 hónapon keresztül. Az egerek egy másik csoportja egyszeri magas dózisú DX kezelést kapott, majd folyamatosan alacsony dózist (2mg/kg) minden második napon egy hónapon keresztül.

Génexpresszió megváltoztatása

Retrovirális konstrukciók

Wnt4: A Wnt4 szekvenciát teljes Wnt4 (humán) cDNS szekvenciát hordozó vektorból szubklónoztuk.

LAP2 α : A teljes hosszúságú LAP2 α cDNS-t tartalmazó plazmid Dr. Simon Amos bocsátotta rendelkezésünkre (Institute of Haematology, Chaim Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel).

PKC δ : A PKC δ szekvenciát pHACE vektorba építve Dr. Jae-Won Soh (Professor of Biochemistry at Inha University, Korea) bocsátotta rendelkezésre.

A GFP, LAP2 α és Wnt4 overexpresszáló TEP1 sejtvonalakat retrovirális vektorokkal készítettük

A Wnt4 és PKC δ szekvenciákat amplifikáltuk és a MGRI retrovirális vektorba klónoztuk. A retrovírusokat a plazmid DNS Lipofectamine általi Phoenix csomagoló sejtvonalba történő transzfekciójával gyártottuk.

PKC δ - siRNA tranziens transzfekciója

A sejteket 80%-os konfluencia eléréséig tenyésztettük, majd PKC δ -ra specifikus és kontrol siRNS-t juttattunk be lipofectamin-nel a gyártó ajánlása szerint. A PKC δ mRNS szinteket qRT-PCR technikával monitoroztuk Wnt kezelés előtt.

A gének transzkripciójának detektálása

cDNS készítés

Mind a sejtvonalakból mind a szövetekből először totál RNS-t izoláltunk TRI-reagens vagy RNS izoláló kit felhasználásával, majd ebből készítettünk cDNS-t. Random hexamer primerek segítségével 0.5 μ g total RNS-ből reverz transzkripciót végeztünk 50 μ l végtérifogatban.

Microarray analízis

Minden egyes kezelt minta esetében 3 független microarray kísérletet végeztünk. A microarray és microarray adatok analízise a Debreceni Egyetem, Genomika központjában készült.

Valós idejű kvantitatív RT-PCR

Szekvencia specifikus primerek és SYBR Green PCR mastermix felhasználásával a reakciókat ABI Prism 7900HT rendszeren mértük le. A relatív transzkriptum mennyiségét β -actin PCR ampikonra történő normalizálás után számítottuk ki. Minden egyes reakció esetében disszociációs görbe analízise által ellenőriztük, az adott termék specifikus amplifikációját.

Sejtek szortolása

A TEP1 sejteket MIG-WT- PKC δ -GFP illetve Wnt4-GFP rekombináns retrovírusokkal fertőztük meg és a sejtek GFP expressziója alapján szortoltuk őket egy FACSVantage Cell

Sorterrel. A szortolt sejteket mRNS és fehérje extrakció, microarray, qRT-PCR illetve Western blot céljából gyűjtöttük össze.

PKC δ aktivitás assay

A kináz assay-t a HTScan Kinase-assay Kit felhasználásával végeztük, melyben egy biotinizált szubsztrát peptidet használtunk a kináz pufferben oldott PKC δ jelenlétében. Aktív PKC δ kináz GST fúziós proteint is tartalmazott a kit (162ng/ μ l (54ng/well) melyet pozitív kontrollként használtunk. A PKC δ specifikus aktivitást kolorimetriás ELISA assay-el mértük 96-lukú streptavidinnel fedett lemezeken (Soft Flow Hungary Kft. Pécs).

Proteinek tisztítása sejtmembránból és citoszólból

TEP1 sejteket Wnt4-et tartalmazó felülúszóval kezeltük 5 percig. Mind a Wnt4-el kezelt, mind a Wnt4-et overexpresszáló sejtvonalból származó sejteket összegyűjtöttük és standard centrifugálásos protokollt alkalmaztunk a membránproteinek összegyűjtésére. A citoszólból és membrán frakciókból származó proteineket 10%-os SDS PAGE-el választottuk el és Western blot-al detektáltuk.

Immunprecipitáció

TEP1 sejteket RIPA pufferben lizáltuk, melyet proteáz és foszfatáz inhibitorokkal egészítettünk ki, majd anti-Fz-4, anti-Fz-6 antitestek és Protein-G-t hordozó-gyöngyöket adtunk a fehérje elegyhez és 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán keresztül. Ezután a hordozó-gyöngyöket összegyűjtöttük, mostuk és Western blot-ra készítettük elő.

Western blot technika

A TEP1 sejteket összegyűjtöttük, és a teljes sejtlizátumot 10%-os SDS PAGE-el választottuk el. A géleket nitrocellulóz membránokra blottoltuk. A proteineket felerősített kemilumineszcenciával vizualizáltuk a gyártó útmutatásai szerint. Az analízist a Fuji LAS4000 képalkotó műszerben végeztük a legjobb minőség érdekében különböző, 0,5-6 perces expozíciós időket használva.

Immun-hisztokémia, immun-fluoreszcencia

7-10 μ m vastagságú fagyasztott tímusz metszeteket hideg acetonban vagy paraformaldehidben fixáltuk, szárítottuk majd telítettünk 5%-os BSA-val (BSA-PBS 20 perc) majd festettük őket a megfelelő antitestek felhasználásával 30 percig szobahőmérsékleten. Hisztológiához fluorescens antitesteket használtunk. A metszeteket egy Olympus Fluoview FV1000S-IX81 rendszerrel felszerelt Olympus Fluoview 300 konfokális mikroszkóppal illetve egy CCD kamerával felszerelt és AnalySIS szoftverrel ellátott Olympus BX61 mikroszkóppal végeztük.

3. Célkitűzések

I. A Wnt jelátvitel szerepének vizsgálata a tímusz természetes öregedése során:

1. A tímusz epithéliumában történő Wnt4 jelátvitel és expressziós mintázatok vizsgálata mellett potenciális Wnt4 célpontok azonosítása igen fontos, mivel ezek proliferációs, differenciációs - különösen transz-differenciációs- szabályozó folyamatokra engednek következtetni a tímusz epithéliumban

2. Mivel a Wnt4 képes aktiválni mind a kanonikus mind a nem-kanonikus jelátviteli útvonalakat és szabályozni a TEC identitását, a Wnt4 jelátviteli folyamatban résztvevő elemek azonosítása – különös tekintettel a PKC δ -ra – nagyban hozzájárulhat a tímusz öregedésének szabályozásában résztvevő mechanizmusok megértéséhez.

II. A tímusz természetes és mesterségesen indukált öregedésének összehasonlítása:

3. A természetes és GC indukálta tímusz öregedésben résztvevő molekuláris mechanizmusok összehasonlítása felfedheti számunkra, hogy a molekuláris jellemzők azonosak vagy különbözőek-e a két folyamat során. A folyamatok megismerése segítséget nyújthat abban is, hogy azonosíthassunk molekuláris célpontokat, melyek a GC mellékhatásait enyhítik illetve olyan molekuláris terápiás célpontokat, melyek által elkerülhetővé válhat a *de novo* T-sejt termelés csökkenése.

4. Eredmények

Az eredmények összefoglalása

A tímusz természetes öregedése

1. Az egér tímusza az emberéhez hasonló morfológiai változásokon megy keresztül
2. Amíg a Wnt4 aktivitása csökken, addig a LAP2 α aktivitása nő a folyamat során
3. Az elzsírosodással együttjáró tímusz visszafejlődést a LAP2 α , ADRP és PPAR γ irányítja
4. Az elzsírosodással együttjáró tímusz visszafejlődés az E-cadherin csökkenése által jelzett EMT előzi meg
5. A Wnt4 csökkenteni képes a zsírsejt-típusú transzdifferentiációért felelős gének expresszióját
6. A Wnt4 receptorok szintje - melyek a β -catenin útvonalra nézve aktivációs (Fz-4) és gátló (Fz-6) jeleket továbbítanak - emelkedik az öregedés korai szakaszában
7. A PKC δ a Wnt4 jelek hatására aktiválódik
8. A PKC δ asszociálódik mindkét receptorral, de elsősorban a Fz-6-tal
9. A Wnt4 célgénje a CTGF és a receptorai közül a Fz8 részt vesznek a negatív regulációs visszacsatolásban, amely a Wnt-jel továbbítás kanonikus útvonalát szabályozza

A tímusz szteroidok által indukált öregedése

10. Hasonlóan a természetes úton történő öregedéshez, a Wnt4 termelés csökken, míg a LAP2 α termelés növekedik a DX által indukált tímusz visszafejlődés során
11. A Wnt4 képes megvédeni a tímuszt a DX által kiváltott zsírszerű transzdifferentiációval szemben

5. Megbeszélés

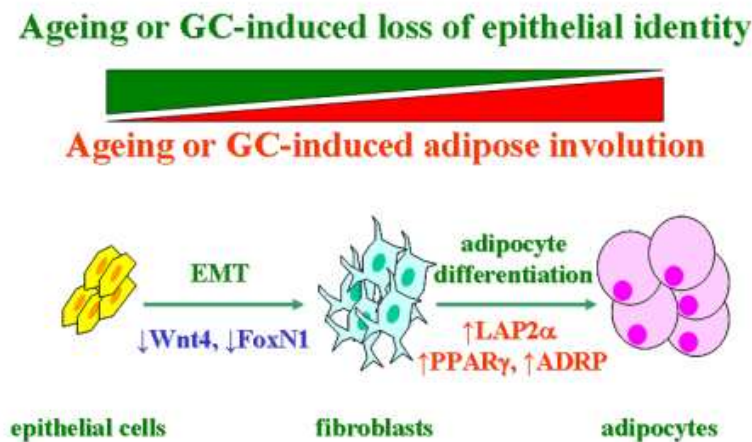
A Wnt molekulák nagyon sok sejtszintű folyamat irányításában vesznek részt a tímuszban és más szervekben egyaránt. A tímuszban a Wnt4 az egyik prominens Wnt molekula, amely a sejt-sejt interakciókat, migrációt, proliferációt szabályozza célgénének expressziójának módosításán keresztül. A Wnt4 igen fontos szerepet játszik a tímusz organogenezisében és a kifejlett tímusz fiziológiai folyamatainak szabályozásában is. A Wnt4 szekvenciája nagymértékben konzervált. Noha a Wnt4 képes kifejteni hatását a nem-kanonikus jelátviteli hálózaton keresztül is, a tímuszon belül a Wnt4-et mint a kanonikus, β -catenin jelátviteli útvonal aktivátorát ismerjük. Mivel a Wnt-ok, különösen a Wnt4 ismert regulátora mind a tímocita fejlődésnek, mind a TEC fenntartásának, a kérdés természetesen adódott, hogy nincse szerepe a Wnt4-nek a tímusz öregedésében?

A modellrendszer kiválasztására nagy hangsúlyt fektettünk, mivel a rágcsálók szövetei nem feltétlenül mutatják az emberek esetében lezajló korrall kapcsolatos változásokat. Az általunk elvégzett öregedő egerek tímusz szövetein történő immunhisztokémiai analízis alapján a kísérleteink bizonyítékokat szolgáltatott arra, hogy egérben a tímusz szöveteinek rendezetlensége ugyanúgy kialakul öregedés során, mint ahogyan ez az emberi szöveteken megfigyelhető. A határvonal a tímusz kéreg és velőállománya között egyre kevésbé lesz kifejezett és a medulla mérete fokozatosan csökken. GFP transzgenikus állatokban zsírszövet specifikus festési eljárást alkalmazva az elzsírosodási folyamat mechanizmusa nagymértékben hasonlónak bizonyult ahhoz, amit öregedő emberi tímuszban figyelhetünk.

Az öregedő tímusz szövetek molekuláris analízise során kiderült, hogy a morfológiai változások a Wnt4 aktiváció csökkenésével és a zsírszerű transzdifferentiációért felelős gének (LAP2 α , PPAR γ , ADRP) expressziójának növekedésével járnak együtt. Annak eldöntésére, hogy a TEC-ek közvetlenül zsírsejteké, vagy először fibroblsztokká, majd később adipocitákká differentiálódnak-e, egy egyszerű immunfluoreszcens festést alkalmaztunk ahol az epitheliális marker EpCAM1 és a fibroblsztok marker ER-TR-7 ko-lokalizációját vizsgáltuk. A kísérletünk bizonyítékot szolgáltatott arra, hogy adipociták nem vándorolnak be a tímuszba az öregedés során, hanem helyben termelődnek többszörösen összetett transzdifferentiációs lépések során.

Összefoglalásképpen megállapíthatjuk, hogy a TEC dedifferentiációja EMT-t indukál először, majd a létrejövő fibroblsztok az adipocita elköteleződés felé történő hagyományos differentiációs program szerint alakulnak át, melyet a Wnt4 és LAP2 α folyamatosan változó

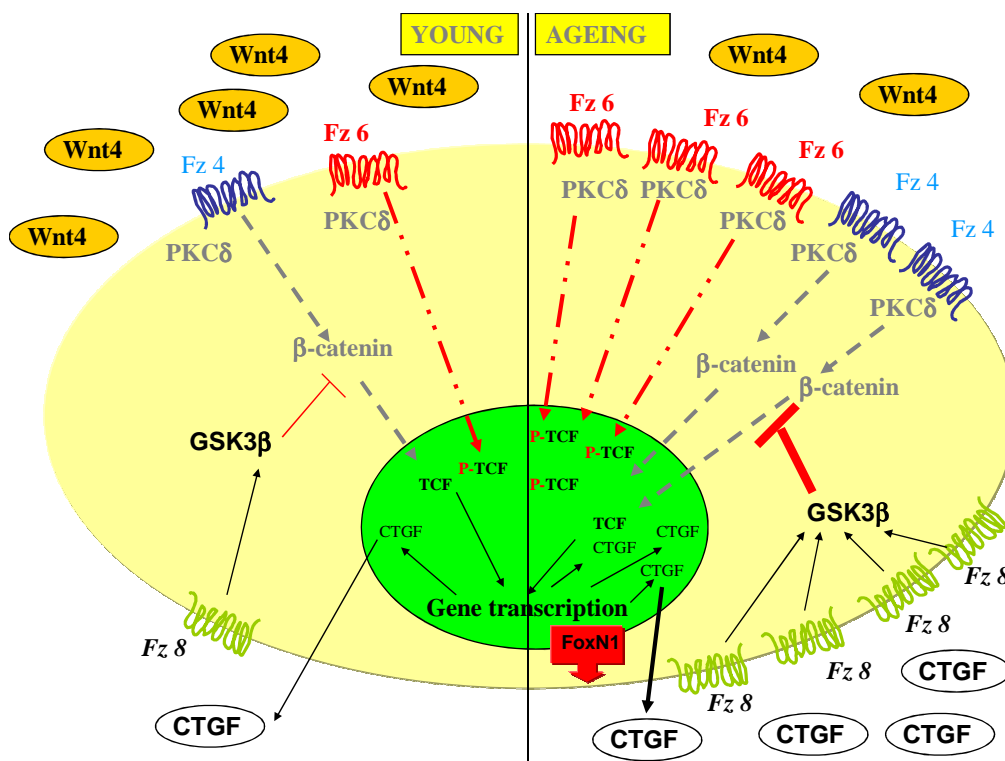
aránya irányít. A jelenlegi ismereteinket az adipoid tímusz visszafejlődésről a 1. ábrában foglaljuk össze.



1. ábra A tímusz öregedése során történő adipoid visszafejlődés modellje.

Érdekes tény hogy a GC-k hasonló molekuláris változásokat indukálnak, mint amiket a természetes öregedés során tapasztalhatunk, és szintén elzsírosodással egybekötött tímusz visszafejlődéshez vezetnek. A Wnt4 központi szerephez jut ebben a visszafejlődésben, mert a TEC identitás elvesztése és az adipocita transzdifferentiáció szoros összefüggésben vannak a Wnt4 és FoxN1 szintek csökkenésével és a LAP2 α szint emelkedésével. Mivel a tímusz elzsírosodási folyamata visszafordítható és a TEC identitás visszaállítható a belső Wnt4 szintek emelésével vagy külső Wnt4 beadásával, ezen eredményeink kiemelték a Wnt4 jelátvitelét fontos szabályozó szerepét a tímusz involúciójában. Bár a fiziológiai modell felállítása fontos, a kérdés még fennáll: melyek azok a jelátviteli lépések, melyek képesek a β -catenin függő Wnt jelátviteli útvonalat oly mértékben gátolni, hogy a tímusz visszafejlődésének folyamata megindulhasson? Ezen folyamatok vizsgálatára, klónozott Wnt4 alkalmazásával történt jelátviteli kísérletek alapján Wnt4-re specifikus célgéneket azonosítottunk, és egy megbízható read-out rendszert állítottunk fel. A vizsgálataink központjába a Fz-4 és Fz-6 receptorok felől érkező Wnt4 jelek átviteléhez kapcsolódó molekulák vizsgálatára fektettünk hangsúlyt, mivel az irodalmi adatok ezt a két receptort azonosították, mint Wnt4 receptorait. Világossá vált, hogy a PKC δ mindkét receptorból történő jelátviteli folyamatban részt vesz, és a PKC δ elsősorban a Fz6-tal lép kapcsolatba, amely jelátviteli útvonal a β -catenin jelátvitelét negatív regulátora. Vizsgálataink ezen kívül bebizonyították, hogy a β -catenin függő Wnt jelátvitelét erőteljesen csökken az öregedés során, többszörös negatív visszacsatoló körök aktiválódása révén a következő lépésekben: Az

öregedés folyamán a Wnt4 szintek csökkennek, míg a receptorok - arányaiban a Fz-6 jobban - expressziós szintje emelkedik. A β -catenin függő Fz-4 jelek a CTGF megemelkedett expressziójához vezetnek, amely egy β -catenin függő célgén, és szintén szerepet játszik a negatív visszacsatoló körben. A CTGF receptora a Fz-8 szintén emelkedik a GSK3 β emelkedett aktivitásához vezetve, mely foszforilálja a β -catenint, elősegítve ezzel a β -catenin proteozómában történő lebomlását. Az összes említett jelátviteli esemény a FoxN1 csökkenéséhez és a TEC-re jellemző tulajdonságok elvesztéséhez vezet megnyitva ezzel az utat az olyan molekuláris történések előtt, melyek adipocita típusú transzdifferentiációhoz vezetnek. A tímusz öregedésével kapcsolatos molekuláris eseményeket a 2. ábrában foglaltuk össze.



2. ábra A tímusz öregedésben szerepet játszó molekuláris mechanizmusok modellje

Jelen munkánk során bizonyítottuk, hogy mind a Wnt4 mind a LAP2 α kulcs szerepet játszik a természetes és indukált tímusz öregedésben. Ezen faktorok pontosan szabályozott egyensúlya határozza meg a tímusz öregedés sebességét. Az öregedés során bekövetkező jelátviteli folyamatok részleteit megismerve lehetőség nyílik olyan molekuláris célpontok azonosítására, melyek természetes T-sejt termelést képesek visszaállítani vagy akár laminopátiákban - ahol a lamin protein család tagja a LAP2 α - is fontos szerepet játszik - terápiás célpontok azonosításában.

6. Következtetések

A tézis legfontosabb következtetései

Egérben, hasonlóan az emberhez, a magasfokú rendezettséget mutató tímusz epithelium rendezetlenné válik és elzsírosodással összekötött zsugorodáson megy keresztül. Ez az egér tímuszt megfelelő model rendszerré teszi a tímusz-öregedés molekuláris hátterének vizsgálatára.

Mind a természetes mind a glükokortikoidok által indukált öregedés a Wnt4 csökkenése és a LAP2 α szintek növekedése által szabályozott.

A Wnt4 szintek emelése megóvhat az adipoid transzdifferentiáció és a tímusz visszafejlődésével szemben

A Wnt4 szintek csökkenése EMT-t indít el.

A LAP2 α növekedése zsírszerű transzdifferentiációt vált ki a fibroblasztokhoz hasonló sejtekké alakult epiteliális sejtekben

PKC δ részt vesz a Wnt4 jelek továbbításában mindkét Fz-4 és Fz-6 Wnt receptor esetén. PKC δ azonban elsősorban a Fz-6-hoz kapcsolódik, amely negatív, β -catenin gátló, jeleket továbbít, amelyek a β -catenin függő gének átíródását gátolják.

A β -catenin dependens célgén CTGF és egyik receptorának (Fz-8) szintje a tímusz öregedése során emelkedik. Mivel a CTGF/Fz-8 jelek részt vesznek a negatív visszacsatoló mechanizmusban, mely a β -catenin függő jeleket továbbítja, ez a jelátviteli útvonal hozzájárul az EMT folyamatának beindításához és az adipoid transzdifferentiáció előkészítéséhez.

A tímusz öregedés több komponensből álló folyamat, komplex molekuláris interakciókkal, amelyek a Wnt jeltovábbítási útvonal gátlásához vezetnek megengedve ezzel az adipocita típusú transzdifferentiációt

7. Közlemények

A tézisekhez kapcsolódó közlemények:

Cikkek:

Varecza, Z., Kvell, K., Talaber, G., Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G., Jenkinson, E.J., Pongrácz, J.E.: Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence.

2011. Mech Ageing Dev. (in press, available online 27. April 2011) (IF: 4.2)

Talabér, G., Kvell, K., **Varecza, Z.**, Anderson, G., Jenkinson, J.E., Boldizsar, F., Berki, T., Pongrácz, J.E.: Wnt4 protects thymic epithelial cells against Dexamethasone-induced senescence.

2011. Rejuv.Res., 14(3) Epub (IF: 4.2)

Kvell, K., **Varecza, Z.**, Bartis, D., Hesse, S., Parnell, S., Anderson, G., Jenkinson, E.J., Pongrácz J.E.: Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence.

2010. PLoS One, 5(5):e10701 (IF: 4.35)

Impakt faktor: 12.75

Összes impakt faktor: 20.75

Független citációk: 36

A tézisekhez kapcsolódó poszteres előadások:

Varecza, Z. Kvell, K, Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G. Jenkinson E.J. and Pongracz, J.E.

Wnt Modulates Notch Pathway Associated Gene Expressions in Primary Thymic Epithelium of Balb/c Mice

2009 Wnt meeting, LOMBARDI COMPREHENSIVE CANCER CENTER, GEORGETOWN UNIVERSITY, Washington DC, USA, 11-14 June 2009

Varecza, Z. Kvell, K Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G. Jenkinson E.J. and Pongracz, J.E.

Novel and atypical PKCs are involved in non-canonical Wnt signaling

Wnt Signaling in Development and Disease, Max Delbrück Communications Center, Berlin-Buch, 12 – 15 September 2007.

Varecza, Z. Kvell, K Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G. Jenkinson E.J. and Pongracz, J.E.

Novel PKCs are involved in Wnt signaling

IV. International Conference on Molecular Recognition (Pecs), Aug. 15-18, 2007

Varecza, Z. Kvell, K Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G. Jenkinson E.J. and Pongracz, J.E.

Novel and atypical PKCs are differentially involved in non-canonical Wnt signalling in thymic epithelial development in mice

The traditional Wnt meeting, UCSD, La Jolla (California), June 21-23, 2007

Kvell, K, **Varecza, Z.** Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G. Jenkinson E.J. and Pongracz, J.E.

Wnt glycoprotein-triggered changes of gene expression in murine thymic epithelial cells The traditional Wnt meeting, UCSD, La Jolla (California), June 21-23, 2007.

Varecza, Z. Kvell, K, Miskei, G. Anderson, G, Jenkinson E.J. Pongrácz, J.E.

PKCs differentially regulate Wnt signalling in thymic epithelium in mice

Annual meeting of the Hungarian Society for Physiology, Pecs, june 5-8,2007

Varecza, Z. Kvell, K, Miskei, G, Anderson, G, Jenkinson E.J, Pongrácz, J.E.

Novel and atypical PKCs are involved in Wnt signalling in thymic epithelium in mice

Annual meeting of the Hungarian Society for Membrane Transport, Sumeg, may 22-25, 2007

Varecza, Z. Kvell, K Miskei, G., Parnell, S.M., Anderson, G. Jenkinson E.J. and Pongracz, J.E.

Protein kinase C dependent expression of AIRE transcription factor regulates autoimmunity

Annual meeting of PhD students, Semmelweis University, Budapest, apr. 12-13, 2007

Egyéb közlemények

Cikkek

Varecza Z., Elekes K, László T, Perkecz A, Pintér E, Sándor Z, Szolcsányi J, Keszthelyi D, Szabó A, Sándor K, Molnár TF, Szántó Z, Pongrácz JE, Helyes Z.:

Expression of the Somatostatin Receptor Subtype 4 in Intact and Inflamed Pulmonary Tissues.

2009. J Histochem Cytochem., 57(12):1127-1137. (IF:2.5)

Jakab F., Horvát G., Ferenczic E., Sebők J., **Varecza Z.**, Szűcs G.,

Detection of Dobrava hantaviruses in Apodemus agrarius mice in the Transdanubian region of Hungary

Virus Res. 2007 Sep;128(1-2):149-52. Epub 2007 May 23 (IF:2.56)

Pócsi I, Molnár Z, Pusztahelyi T, **Varecza Z.**, Emri T.

Yeast-like cell formation and glutathione metabolism in autolysing cultures of *Penicillium chrysogenum*.

Acta Biol Hung. 2007 Dec;58(4):431-40 (IF:0.55)

Varecza Z., Emri T., Pusztahelyi T., and Pócsi I.

A novel aspect of NADPH production in ageing *Penicillium chrysogenum*.

Acta Biol Hung. 2006 Mar;57(1):115-21. (IF:0.55)

Emri T., Molnár Z., Pusztahelyi T., **Varecza Z.**, and Pócsi I.

The FluG-BrlA pathway is involved in the regulation of autolysis in *Aspergillus nidulans*

Mycol Res. 2005 Jul;109(Pt 7):757-63 (IF:2.92)

Sámi, L., Pusztahelyi, T., Emri, T., **Varecza, Z.**, Grallert, Á., Karányi, Zs., Kiss, L. and Pócsi, I.

Autolysis and ageing of *Penicillium chrysogenum* cultures under carbon starvation: Chitinase production and antifungal effect of allosamidin.

(2001) J. Gen. Appl. Microbiol. , 47, pp. 201-211 (IF:0.95)

Könyvfejezet:

Pócsi I., Emri T., **Varecza Z.**, Sámi L. and Pusztahelyi T.

Allosamidin inhibits the fragmentation and autolysis of *Penicillium chrysogenum*.

(2000) In: Advances in Chitin Science, Vol. 4. Eds. Peter, M.G., Domard, A. and Muzzarelli, R.A.A. pp. 558-564.

8. Köszönetnyilvánítás

Szeretném hálámat kifejezni mentoromnak, Dr. Pongrácz Juditnak, aki útmutatásával mellettem állt a kutatásban és személyes dolgokban is munkám és tanulmányaim során.

Köszönettel tartozom Prof. Dr. Németh Péternek, aki lehetővé tette munkámat az Immunológiai és Biotechnológiai Intézetben.

Köszönöm közvetlen munkatársaimnak Dr. Kvell Krisztiánnak és Dr. Talabér Gergelynek akikkel sok dolgos órát töltöttünk a laborban, majd elemeztük a kísérleti eredményeket és az Élet értelmét barbecue-zás közben.

Köszönöm a meleg fogadtatást és az évek sorány nyújtott segítséget az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet összes munkatársának.

Köszönöm Dr. Berta Gergelynek a konfokális mikroszkópiás vizsgálatokban, és Dr. Pauler Gábor barátomnak a microarray kísérletek analízisében nyújtott segítségért.

Külön hálával tartozom szüleimnek, Édesanyámnak aki mindvégig bíztatott engem és Édesapámnak aki megtanított hogyan kell türelmesnek lenni és hogyan váljak kutatóvá. Köszönettel tartozom gyönyörű menyasszonyomnak Jankának, szeretett nagynénéimnek Terkának és Edinek, unokatestvéreimnek és családjaiknak, Csabának a hosszú beszélgetésekért, Jocónak, aki a biológia iránti érdeklődésemet felkeltette és Ferinek aki a karrieremet egyengette a kiváló atmoszféréért és az általuk nyújtott háttérért, amelyben nyugodtan végezhettem a kutatásaimat.