

**A tímusz öregedésének molekuláris mechanizmusa:
új intervenciós célpont azonosítása**

Doktori (PhD) értekezés tézisei



Ernszt Dávid

Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola

Az Immunológia Alapjai Program

Doktori iskola vezető: Prof. Dr. Szekeres Júlia

Programvezető: Prof. Dr. Berki Tímea

Témavezető: Dr. Kvell Krisztián

Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2018.

Bevezetés

Az immunrendszer feladata a külső patogének elleni védelem és a szervezet hibás működésű sejtjeinek eltávolítása. Az immunrendszeren belül megkülönböztetünk veleszületett és szerzett (adaptív) immunitást, illetve sejtes és humorális immunitást. Az adaptív immunitás sejtes elmei a T- és a B-limfociták. Az öregedés az immunrendszerre is hatással van. A kor előrehaladtával az immunválasz mértéke csökken, a betegségek kialakulása gyakoribbá válik. Az öregedés a T-sejtes immunitásban könnyen tetten érhető. Mivel a T-limfociták részt vesznek a kórokozók elleni védekezésben, a meghibásodott T-sejtek eltávolításában és az immunrendszer szabályozásában is, csökkent funkcionalitásuk hozzájárul az idős korban gyakrabban előforduló tumoros elváltozások, autoimmun betegségek és fertőzések kialakulásához. Ugyanezen folyamat felelős a (T-dependens) oltások csökkent hatékonyságáért, mely szintén az idősebb korosztályt érinti. Az öregedés elsősorban nem a meglévő T-sejtekre van hatással, hanem a T-limfociták termelődésének folyamatára. Ezen belül is főként a csecsemőmirigy, másnéven tímusz érinti. Ennek a szervnek az a feladata, hogy niche-t biztosítson a csontvelőben képződő T-limfocita előalakok érésének és szelekciójának. Megfelelő működése esetén folyamatosan biztosítja az új, úgynevezett naiv T-sejtek termelődését, melyek képesek az idegen fehérjék felismerésére, de nem reagálnak eliminációval a szervezet saját fehérjeire. A tímusz funkcionálisan legfontosabb része az epitél hálózat, mely két fő részre osztható: kortikális és medulláris állományra. Öregedés során ez az epitél hálózat felbomlik és állománya lecsökken, valamint az epitél sejtek helyét átvevő zsírsejtek megjelenése is megfigyelhető. Egyre elfogadottabb az a nézet, hogy a tímusz öregedése során az új epitél sejtek képződése lassul, így számuk lecsökken, valamint egyes epitél sejtek funkciójukat veszítve adipoid irányba transzdifferentiálódnak. Ezen folyamat egyik kiváltó oka a pubertás során nagy mértékben megemelkedő szexuál-szteroid hormonszint. Ezt az elképzelést erősíti az a megfigyelés is, hogy egyes szteroid alapú gyógyszeres kezelések az öregedéshez hasonló elváltozásokat okoznak a tímuszban, valamint az a tény is, hogy egyes szteroid vegyületek az adipoid irányú differentiálódásnak kedveznek. A zsírszövet fejlődésének egyik elengedhetetlen és központi résztvevője a PPAR γ transzkripciós faktor. Ennek aktiválódása rendszerint adipoid irányú fejlődést indukál. Fokozott PPAR γ működést fiziológiásan öregedő és szteroid-kezelt egerek tímuszában is megfigyeltek. Egyértelmű bizonyítékok vannak arra, hogy a tímusz elzsírosodásában a PPAR γ fontos szerepet játszik. Ezen tanulmány célja, hogy megvizsgálja milyen hatással van a PPAR γ funkcióvesztése a tímusz öregedésére és az időskori immunológiai funkciókra.

Irodalmi áttekintés

Tímusz

A tímusz, más néven csecsemőmirigy, a T-limfociták fejlődéséért felelős immunológiai szerv. A csontvelőből érkező T-sejt előalakok itt osztódnak és differenciálódnak. Érésüket befejezve naiv T-sejtként elhagyják a tímuszt, hogy a periférián ellássák funkciójukat. A tímusz feladata továbbá a funkcióképtelen és a káros autoreaktív T-sejtek eltávolítása is. Ez a folyamat biztosítja, hogy a perifériára vándorló T-sejtek nem aktiválódnak a szervezet saját antigénjeire, de idegen antigén felismerése esetén megfelelő immunválaszt indukálnak.

A tímusz fejlődése

A tímusz embrionális fejlődését egérben részletesen megfigyelték. A tímusz a harmadik garatív endodermális részéből fejlődik ki az embrionális kor 10,5. napjától kezdődően. Fejlődése kezdetben a velőcső eredetű mesenchymális sejtekből és perivaszkuláris kötőszöveti sejtekből indul meg [1]. Először a terhesség 12. napján érkeznek hematopoetikus progenitorok a tímuszba [2]. Ebben az állapotban még éretlen a tímusz epitél állománya, és olyan bipotens sejtekből áll, amik később képesek mind medulláris, mind kortikális epitél sejtekké fejlődni [3]. A timociták jelenléte szükséges, hogy megfelelően végbe menjen a tímusz stroma organizációja [4]. A tímusz epitél hálózata által közvetített szignálok elengedhetetlenek a timociták fejlődéséhez, a timocitákból érkező jelek pedig nélkülözhetetlenek a tímusz stroma sejteinek a működéséhez és fenntartásához [5].

A kortikális és medulláris tímusz epitél sejtek differenciálódásához rendkívül fontos a FoxN1 (forkhead box protein N1) transzkripció faktor jelenléte [6][7]. A közös előalakból származó epitél sejtek, később két funkcióban és lokalizációban jól elkülöníthető csoportot alkotnak. A kortikális epitél sejtekre a citokeratin 8, EpCAM1 (epithelial cell adhesion molecule), Ly51 (glutamyl aminopeptidase), CD205, MHC-I és MHC-II molekulák expressziója jellemző. A medulláris epitél sejtek citokeratin 5, CD326, MHC-II és CD80 markereket expresszálnak [8]. A medulláris epitél sejtek további két alcsoportra oszthatók az MHC-II és CD80 expresszió alapján [4].

A tímusz medulláris kompartmentjének megfelelő fejlődése kiemelten fontos, hisz a medulláris epitélium és a B-sejtek végzik a negatív szelekciót, mely során az autoreaktív T-sejtekben apoptózist indukálnak. A medulláris epitélium egyik egyedi funkciója, hogy random expresszálja a sejt minden saját antigénjét, ezzel ellenőrizve a fejlődő T-sejtek autoreaktivitását. [9].

A tímusz funkciója, a T-sejtek fejlődése

A tímusz legfőbb feladata a T-sejtek érésének és szelekciójának irányítása. A tímusz biztosítja azt a mikrokörnyezetet és azokat a stimulusokat, melynek eredményeként a csontvelőből származó T-sejt előalakok funkcióképes, a szervezet saját antigénjeire toleráns T-limfocitákká fejlődnek. A T-sejtek a csontvelőben keletkeznek, amit fejlődésük korai szakaszában elhagynak és a tímuszba vándorolnak. A csontvelőből származó előalakok a kortikomedulláris junkció területén lépnek be a tímuszba [10]. Ezek az előalakok még nem expresszálják sem a TcR-t, sem a CD4 és CD8 sejtfelszíni molekulákat, így dupla negatív (DN) sejteknek nevezzük őket [11]. A DN sejteket a CD25 és CD44 markerek expressziója alapján további alcsoportokra oszthatjuk. A DN1 sejtek ($CD44^+/CD25^-$) $\alpha\beta$ T-sejtekké, $\gamma\delta$ T-sejtekké, sőt akár NK sejtekké is differenciálódhatnak [12]. A tímuszba érkező korai T-sejt előalakok a kortikális epitél sejtek által termelt DLL4 (Notch ligand) és IL-7 citokin hatására indulnak el a T-sejtes differenciálódás útján [13][14]. A T-sejt irányú elköteleződést követően a sejtek a DN2 ($CD44^+/CD25^+$) fázisba lépnek, megindul a T-sejt receptor β láncának génátrendeződése miközben a sejtek keresztül vándorolnak a tímusz kortikális területén [12]. A DN3-as ($CD44^-/CD25^+$) szakaszban felépül a pre-TcR komplex, mely gátolja az apoptózist, beindítja a TcR α lánc génátrendeződését, és sejtosztódást indukál a fejlődő T-sejtekben [15]. A pre-TcR komplex gátolja a CD25 expressziót, így a sejtek a DN4 ($CD44^-/CD25^-$) fázisba lépnek, ahol megkezdődik a CD4 és CD8 sejtfelszíni molekulák expresszálása, mellyel a sejtek a dupla pozitív (DP) fázisba kerülnek [16]. A DP sejtek, már teljesen funkcionális TcR-rel rendelkeznek. A fejlődő T-sejtek a DP stádiumban esnek át a pozitív szelekción, a tímusz kortikális területén [17].

A kortikális epitél sejtekben speciális proteolitikus folyamatok játszódnak le, aminek eredményeként a pozitív szelekcióhoz szükséges egyedi peptidek expresszálódnak az epitél sejtek felszínén, az MHC molekulákkal együtt [18][19]. Amikor a DP T-sejtek kapcsolódnak a tímusz kortikális epitél sejtjein expresszált MHC molekulákhoz, túlélést-elősegítő jelátvitel indul el az enyhe affinitást mutató sejtekben. Az affinitással nem rendelkező, vagy túl erős affinitást mutató sejtekben apoptózis indukálódik. A pozitív szelekciót túlélő T-sejtek $CD4^+$ vagy $CD8^+$ SP (single pozitív) sejtekké differenciálódnak attól függően, hogy melyik MHC molekulához mutatnak nagyobb affinitást. Az MHC-I a CD8, míg az MHC-II molekula a CD4 irányú differenciálódást serkenti [20].

A pozitív szelekción átesett T-sejtek expresszálják a CCR7 kemokin receptort, és a tímusz medulláris régiói felé vándorolnak, ahol a medulláris epitél sejtek expresszálják a CCR7

ligandjait a CCL19-et és a CCL21-et [21]. A medullában a dendritikus sejtek és a medulláris epitél sejtek végeznek antigén prezentációt. Saját antigénekre adott pozitív válasz esetén az autoreaktív T-sejtekben apoptózis indul meg. Ezt a folyamatot nevezik negatív szelekciónak [22]. Azért, hogy a sejt összes saját antigénjére tesztelve legyenek a T-sejtek, a tímusz medulláris epitél sejtjei random expresszálják a genomban megtalálható összes fehérjét, és prezentálják őket a fejlődő T-sejteknek. A folyamat egyik fő regulátora az AIRE [23]. A negatív szelekció során szinte az összes autoreaktív T-sejt eliminálódik. Az autoreaktív T-sejtek fennmaradó része nem apoptotizál. Ezek a sejtek Foxp3 transzkripciós faktort expresszálnak és belőlük alakulnak ki a regulátor T-sejtek [24]. A negatív szelekciót túlélő immár érett, naiv T-sejtek elhagyják a tímuszt és a periférián lévő immunológiai szövetekbe vándorolnak.

A tímusz öregedése

A tímusz öregedése a többi szövetnél jelentősen korábban megkezdődik. A tímusz epitél állományának csökkenése emberben már gyermekkorban elkezdődik, a pubertás során felgyorsul és 40-50 éves korban a tímusz kapacitása 10%-ra csökken [25] [26]. A tímusz öregedésével együtt jár a T-sejtes immunitás csökkent funkcionalitása, ami a fertőzések, tumoros elváltozások és autoimmun betegségek kialakulásának magasabb kockázatát eredményezi idős korban [27].

A tímusz öregedése egerekben részletesebben ismert. Az itt megfigyelt folyamatok bár sokban egyeznek az embereknél leírtakkal, azonban néhány eltérést is megfigyeltek a két faj között. Ilyen például, hogy míg egerekben a tímusz mérete folyamatosan csökken az öregedés során, addig emberekben a tímusz mérete lényegesen nem változik, azonban a funkcionális szöveti részek helyét felváltják a megnagyobbodó perivaszkuláris terek és a zsírszöveti állomány [28].

A tímusz öregedése egereknél 7 hetes korban kezdődik [29]. Három hónapos kortól már egyértelműek a tímusz szerkezeti változásai [30]. A kortex-medulla határok elmosódnak [29], a medulla szerkezete felbomlik [31]. Öregedés során a tímusz stroma állományának összetétele megváltozik. Az epitél sejtek száma csökken, a fibroblasztok száma nő, és egyre nagyobb mennyiségben jelennek meg adipociták a tímuszban [4][25]. Az epitél sejtek helyét átvevő adipociták eredetére két fő elmélet létezik. Az egyik elképzelés szerint a tímusz epitél sejtek eltűnésével felszabaduló niche a tímuszon kívülről érkező adipocita előalakok által kerül benépesítésre. Ezek a sejtek itt osztódásnak indulnak és zsírsejteké differenciálódnak [32]. Ezt az elméletet nem támogatja az, hogy a tímusz involúciója együtt jár a tímusz stroma

rezidens sejtjeiben a PPAR γ (peroxisome proliferator activated receptor γ) expresszió erősödésével [30]. Másik elmélet szerint a tímusz epitél elveszti funkcionalitását és epitel-mesenchymális transzformáció (EMT) során fibroblaszt sejté alakul. Ezt követően ezek a fibroblasztok differenciálódnak adipocita irányba. Ezt az elméletet alátámasztják azok a kutatások melyek kimutatták, hogy a tímusz epitél képes EMT-re, és az így létrejött fibroblasztok fokozott PPAR γ expressziót mutatnak, melynek következtében adipocita irányú elköteleződést mutatnak [33].

A tímusz stroma állományának öregedéssel együtt járó hanyatlása és a tímuszban egyre nagyobb arányban megjelenő zsírsejtek, összefüggésben állnak a csökkenő naiv T-sejt termeléssel [34]. A csökkenő naiv T-sejtek száma és a memória T-sejtek arányának növekedése a periférián együtt a T-sejt receptor diverzitás csökkenését eredményezik, ami autoimmun betegségek, daganatos elváltozások, valamint fertőzések kialakulásának valószínűségét növeli [35]. A tímusz medulláris epitél sejtjeiben az antigén prezentációban használt szövet-specifikus antigének expressziója is csökken az öregedés során, ennek következtében a negatív szelekció szintén kevésbé hatékony. Így nagyobb valószínűséggel kerülnek autoreaktív T-sejtek a perifériára, aminek következtében megnő az autoimmun megbetegségek kockázata is idősebb korban [31].

A tímusz korai öregedésének okai és mechanizmusa

A tímusz korai öregedésének okairól több feltételezés is létezik, azonban minden kétséget kizáró módon még egyik elméletet sem sikerült bizonyítani. Az már biztosnak mondható, hogy a tímusz korai öregedése a stroma sejtekből, főként az epitél sejtekből indul ki, és nem a hematopoetikus sejtekből [31]. Ezt támasztja alá, hogy idős egerekből származó csontvelő által termelt T-sejt előalakok is képesek kolonizálni a fiatal tímuszt és ott naiv T-sejtekké fejlődni [36].

A FoxN1 kulcsfontosságú a tímusz epitél sejtjeinek kialakulásában és jelentős változást mutat öregedésük közben. A FoxN1 egy transzkripciós faktor, mely azokat a géneket aktiválja, melyek a tímusz epitél sejtek differenciálódásához szükségesek [37][38]. A FoxN1 egérben az embrionális fejlődés 11. napján, emberben a 6. héten jelenik meg és indukálja a tímusz organogenezist Wnt4 (Wingless/Integrated family member 4) irányítása alatt [39][40][41]. Idős egerekben a FoxN1 expressziójának csökkenését figyelték meg [42] a Wnt4 csökkenésével együtt [43]. Kimutatták, hogy a FoxN1 expresszió mesterséges csökkentése felgyorsítja a tímusz öregedését [44]. Ezzel szemben a tímuszba injektált FoxN1 cDNS részben javította a tímusz funkciót öreg egerekben [45]. A FoxN1 aktivitását a Wnt4 gliko-

lipoprotein szabályozza [40][41], így a Wnt4 közvetlen szerepet játszik a tímusz fejlődésében [46][47]. A Wnt4-et a timociták és az epitél sejtek is termelik [48]. A Wnt4 expressziójának csökkenése együtt jár a tímusz öregedésével [43]. Mivel a FoxN1 aktivitása a Wnt4 jelenlététől függ, így feltételezhető, hogy az öregedés során a FoxN1-aktivitás csökkenése a Wnt4 gátlásán keresztül alakul ki. A kanonikus és nem kanonikus Wnt-jelátvitel változásai egyaránt szerepet játszanak a tímusz öregedésében, de ezek a változások inkább következményei és nem okozói a tímusz öregedésének [31].

A tímusz öregedését jelentősen befolyásolják a hormonális hatások, különösen a szexuáliszteroidok. Ezt támasztja alá az a megfigyelés, hogy ivartalanítást követően a tímusz funkciói valamelyest javulnak [49]. Idősebb egerekben kasztrációt követően a tímusz növekedésnek indul. Azonban ez a regenerálódás átmeneti, pár nap után megáll, majd újabb hanyatlás indul be, ami rövid idő alatt eléri a kasztráció előtti szintet [31]. Ezekből a megfigyelésekből következtethetünk arra, hogy a szexuáliszteroid hormonok jelenléte negatív hatással van a tímuszra. Ezt a feltevést erősíti az a megfigyelés is, hogy a tímusz öregedése a pubertás idején gyorsul fel, amikor a szexuáliszteroid hormonok szintje jelentősen megemelkedik [50].

A tímusz öregedésében szerepet játszik a zsírsejtek differenciálódását irányító PPAR γ transzkripció faktor is. Megfigyelték, hogy a PPAR γ expresszió megnő a tímusz öregedése során [30]. Továbbá kimutatták, hogy a PPAR γ aktivációja negatív hatással van a naiv T-sejt termelésre, csökkenti a T-sejt receptor diverzitást, valamint serkenti a tímusz elzsírosodását [51]. Megfigyelték, hogy a tímusz epitél sejtek képesek EMT útján fibroblasztá alakulni, és ezekben a sejtekben PPAR γ jelenléte mutatható ki [33]. Ezek alapján valószínűsíthető, hogy a PPAR γ központi szerepet tölt be a tímusz elzsírosodásában. Ezt a feltevést tovább erősíti, hogy a szexuáliszteroid hormonok hatással vannak a PPAR γ aktivitásra [52]. Így a pubertással együtt járó hormonális változások a PPAR γ -n keresztül is serkenthetik a tímusz öregedését.

PPAR γ

A PPAR γ a PPAR család tagja. A PPAR család a transzkripció faktorok ligand-indukált nukleáris receptor szupercsaládjába tartozik. Emlősökben háromféle PPAR található: PPAR α , PPAR β/δ és PPAR γ . A PPAR-ok a retinoid X receptorral együtt heterodimert alkotva szabályozzák olyan gének expresszóját, melyeknek a gyulladásban, az anyagcserében és a zsírszövet fejlődésében van szerepük [53]. A PPAR γ erősen expresszálódik fehér zsírszövetben (WAT: white adipose tissue) és barna zsírszövetben is, amelyekben az adipogenezis fő regulátoraként működik. Emellett a PPAR γ az egész szervezet lipid

anyagcseréjének és inzulin háztartásának fontos szabályozója [54][55][56]. A PPAR γ -nak két izoformája létezik, melyek alternatív splicing során jönnek létre. Míg a PPAR γ 1 számos szövetben expresszálódik, addig a 30 aminosavval hosszabb PPAR γ 2 expresszója a fiziológiás körülmények között a zsírszövetre korlátozódik [56][57].

A PPAR γ -t először egy az adipoid differenciálódás során aktiválódó faktorként írták le [56]. Főleg az adipogén és lipogén szignál útvonalak irányítójaként ismert. A PPAR γ -null egéknél megfigyelt tejes zsírszöveti hiány is azt támasztja alá, hogy a PPAR γ az adipocita differenciálódás nélkülözhetetlen szabályozója [58]. A PPAR γ a kifejlődött zsírsejtek megfelelő működéséhez is elengedhetetlen, mert PPAR γ gátlás esetén az adipociták csak pár napig életképesek [59]. Ezen túlmenően a PPAR γ részt vesz a glükóz háztartás szabályozásában és fokozza a sejtek inzulin szenzitivitását [53][56].

A PPAR γ -nak fontos szerepe van számos immunológiai releváns sejtben, mint például a makrofágokban és az antigén-prezentáló dendritikus sejtekben. A dendritikus sejtekben szabályozza a lipid anyagcserét, az antigén felvételét, az érést, az aktivációt, a migrációt és az antigén prezentációt [60]. A makrofágokban a PPAR γ részt vesz a lipid anyagcserében és a gyulladásgátló folyamatokban [61]. Érdekes módon a vizcerális zsírszövetben található CD4⁺ T-sejtek magas PPAR γ expressziót mutatnak, míg más szövetekben található CD4⁺ T-sejtek esetében PPAR γ pozitívitas nem mutatható ki. Ezt a megfigyelést a PPAR γ gyulladáscsökkentő szerepével hozzák kapcsolatban, de pontos funkciója még nem tisztázott [62].

Lipodisztrófia

A lipodisztrófiák heterogén elváltozások, melyeket a különböző zsírszövetek hiánya jellemez [63]. A lipodisztrófiákat két fő csoportba sorolhatjuk. Először a szerzett lipodisztrófiás állapotot írták le, majd csak ezután azonosították az öröklött változatot [64].

Az örökletes, más néven familiáris lipodisztrófiákat főleg parciális, a végtagokról hiányzó, szubkután zsírszöveti hiány jellemzi. Az ebben az elváltozásban érintettek általában normális zsírszöveti eloszlást mutatnak korai gyermekkorban, a zsírszövet eltűnése a későbbiekben alakul ki. A betegek jellemző a zsírszöveti felhalmozódása a lipodisztrófia által nem érintett testtájakon [65]. A betegség szövödményeként diabétesz és anyagcsere problémák általában csak felnőttkorban fejlődnek ki [66].

Az öröklött lipodisztrófiát kiváltó mutációi közül először az LMNA gén mutációját azonosították. Az LMNA gén a sejtmag lamin fehérjéinek szintézisében vesz részt. Mutációja okozza az FPLD (Familiáris Parciális Lipodisztrófia) II-es típusát (FPLD2) [67]. Az LMNA gén mutációja által kialakuló FPLD2 az örökletes lipodisztrófiák leggyakoribb változata [68].

Az FPLD2 betegekben több anyagcsere betegség is kialakulhat, mint például diabétesz, hyperlipidaemia és hypertriglyceridaemia [69]. Az LMNA mutációt követően több egyéb gént is azonosítottak melyek mutációja az FPLD különböző formáihoz vezethetnek, köztük a PPAR γ -t is. A PPAR γ transzkripciós faktor, nélkülözhetetlen szerepet tölt be az adipocita differenciálódásban, domináns negatív mutációja az FPLD III-as típusát (FPLD3) eredményezi [70]. Eddig 20 PPAR γ mutációt írtak le emberben mely FPLD3 kialakulását eredményezte. Szinte mindegyik mutáció a PPAR γ DNS-kötő vagy ligand kötő régiójában található [68]. Az FPLD3 esetében a zsírszöveti hiány a végtagok vége felé erőteljesebb, míg a törzshöz közeli részeken enyhébb. Az arcon, a nyakon és a törzsön zsírszöveti felhalmozódás figyelhető meg [70]. Az FPLD3 leggyakoribb szövődményei az inzulin rezisztencia, a hypertriglyceridaemia és az akut hasnyálmirigy gyulladás [71][72]. Az FPLD3 ritkábban fordul elő mint az FPLD2, és a kialakuló zsírszöveti hiány is enyhébb, ugyanakkor az anyagcsere zavarok súlyosabbak mint FPLD2 esetében [68] [73].

Célkitűzések

Az időskorban jelentkező immunológiai problémák egyik kiváltó oka a tímusz és vele együtt a T-sejtes immunrendszer korai öregedése. Az idő előrehaladtával a tímusz szöveti szerkezete felbomlik, az epitél sejtek helyét zsírsejtek veszik át, melynek következtében csökken a naiv T-sejtek termelődése. A tímusz öregedésének hátterében álló molekuláris folyamatok a mai napig nem teljesen ismertek. Az egyik feltételezett központi szereplő a PPAR γ transzkripciós faktor, mely a zsírsejt fejlődés nélkülözhetetlen irányítója és a lipid anyagcsere szabályozója. Korábbi tanulmányok szerint a PPAR γ túlműködése a tímusz öregedését felgyorsítja. Azonban a PPAR γ hiányának tímusz öregedésre gyakorolt hatásáról nincsenek ismereteink. Ezért tűztük ki célul a tímusz öregedésének vizsgálatát a PPAR γ gén hiányában, egérben és emberben egyaránt.

Kutatómunkám célkitűzései a következők voltak:

1. A tímusz öregedésével járó szerkezeti változások követése PPAR γ hiányában egérben.
2. A PPAR γ hiányállapot naiv T-sejt termelésre gyakorolt hatásának vizsgálata egérben.
3. A T-sejt függő immunológiai funkciók vizsgálata PPAR γ hiányában egérben.
4. A PPAR γ hiányállapot humán relevanciájának vizsgálata.

Anyag és módszer

Állatok tenyésztése és tartása

A kísérleteinkben C57BL/6J, PPAR γ szempontjából háromféle genetikai háttérű (+/+ vad-típusú, +/- heterozigóta, -/- null) törzset alkalmaztunk. A kísérleteink során azonos korú (alomtárs) állatokat használtunk. A PPAR γ transzgenikus állatok előállítás Nadra és munkatársai által leírtak szerint történt [74]. Az egereket a Debreceni Egyetem Általános Orvostudományi Kar Kísérleti állatházában tenyésztették és tartották, szűrt levegőn, 23-25°C-on, 12 órás sötét-világos ciklusban. Autoklávozott pellet táppal és csapvízzel *ad libitum* voltak ellátva. Tartásuk standard méretű (160x137x330 mm) műanyag ketrecekben, sterilizett almon történt. A kísérletek elvégzéséhez az egereket átszállították a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar Immunológiai és Biotechnológiai Intézetének állatházába, ahol az állatokat a korábbi körülményekkel megegyezően tartottuk a kísérletek elvégzéséig. A PPAR γ transzgenikus egereket a Debreceni Egyetem engedélyével Debrecenben tenyésztették (TMF/82-10/2015). A kísérletek elvégzése Pécsen a Pécsi Tudományegyetem részére kiállított engedéllyel történt (BA02/2000-46/2016, TMF/124-11/2017).

Humán tímusz minták

A formalin-fixált, paraffinba ágyazott humán tímusz minták a Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Karának Patológia Intézetéből származtak. A minták minden esetben a tímuszt egyáltalán nem érintő betegségben vagy balesetben elhunyt személyektől származtak. A minták fixálása a halált követő egy napon belül történt. Minden kísérletet, mely humán mintákat is magában foglalt, a regionális és a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ etikai bizottságának a hozzájárulásával és előírásainak betartásával végeztük. Ügyiratszám: 6331/2016.

Immunhisztokémia

A humán tímusz mintákat paraformaldehiddel fixáltuk, majd paraffinba ágyaztuk. 5 μ m vastag szeletek immunhisztokémiai jelölése a következőképpen végeztük: a metszetek először xilollal öblítettük (3x 5perc), majd csökkenő alkohol-koncentrációjú mosás sorozattal (3-3 perc, 96%-80%-70%-50%) távolítottuk el a paraffint. A deparaffinálást követően a metszeteket 5 percig desztillált vízben áztatva rehidratáltuk. Az antigén feltárás Target Retrieval Solution-nel (Dako) történt 97°C-n 30 percig. Ezután a metszetek desztillált vízzel mostuk (2x 5perc), majd az endogén peroxidáz aktivitás blokkolása 3% H₂O₂-t tartalmazó

TBS oldat 15 perces inkubációjával történt. Ezt követően a metszeteket háromszori 0,05% Tween-t tartalmazó TBS oldattal történő mosása után, 3% BSA-t tartalmazó PBS oldattal inkubáltuk 20 percig, majd anti PPAR γ antitesttel (nyúl monoklonális antitest klón: C26H12 Cell Signalling Technology) 12 órán keresztül inkubáltuk 4°C-n. Ezután a metszeteket, háromszori TBS oldatban való mosást követően, peroxidáz konjugált anti nyúl antitesttel (kecske poliklonális antitest DAKO) inkubáltuk 90 percig. A jelölés előhívása DAB oldattal (Dako) történt. A magfestéshez hematoxylin festést alkalmaztunk. Végül a metszetek fedését Faramount Aqueous Mounting Medium-al (Dako) végeztük. A metszetek kiértékelését Panoramic MIDI (3DHistech) szkennelvel és ImageJ szoftverrel végeztük. A hematoxylin festés által kéken jelölődő területeket tekintettük sejtes állománynak. A PPAR γ pozitív területek barna színnel látszanak a metszeteken. A sejtes állomány és a PPAR γ pozitív területek méretének meghatározásához az ImageJ szoftver IHC toolbox [75] bővítményét használtuk.

Immunfluoreszcens jelölések

Egerek tímuszából készült 8 μ m-es fagyasztott metszeteken immunfluoreszcens jelölést végeztük. A metszetek hideg acetonnal fixáltuk, majd száradás után 5%-os BSA oldattal inkubáltuk 20 percig, majd elsődleges antitesttel (nyúl anti PPAR γ monoklonális antitest klón: C26H12 Cell Signalling Technology, FITC konjugált patkány anti EpCAM1 monoklonális antitest klón: G8.8 PTE ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet, PE konjugált patkány anti Ly51 monoklonális antitest klón: 6C3 eBioscience) 12 órán keresztül inkubáltuk 4°C-n. Jelöletlen antitestek esetében másodlagos antitestként Alexa-555 konjugált anti nyúl antitestet használtunk (kecske poliklonális antitest Life Technologies), mellyel 4 órán keresztül inkubáltuk a metszeteket 4°C-n. Mind az elsődleges, mind a másodlagos antitesttel történő inkubálás után PBS-ben mostuk a metszeteket (3x 5perc). A magfestés DAPI-val (Life Technologies) történt. A metszetek analízise CCD (Andor Zyla 5.5) kamerával felszerelt fluoreszcens mikroszkóppal (Nikon Eclipse Ti-U) és NIS-Elements, valamint ImageJ szoftverrel történt.

Áramlási citometriás mérések

A timocita alcsoportokat és a vérben található T-sejt alcsoportokat áramlási citométerrel különítettük el. A sejteket fluorofór konjugált antitestekkel jelöltük, 5% BSA tartalmú PBS oldatban 4°C-on 60 percig, majd 5% BSA tartalmú PBS oldatban mostuk a mintákat. Minden méréshez 100.000 sejtet jelöltünk. A méréseket és az analízist FACSCanto II citométerrel és

FASCDiva (Becton Dickinson) szoftverrel végeztük. Minden esetben a morfológiai limfocita kapu alapján 10.000 eseményt rögzítettünk. A timocita alcsoportok meghatározásához CD4-Alexa647 és CD8-FITC antitestet használtunk. A vérben keringő T-sejt alcsoportok vizsgálatához a következő antitesteket használtuk: Becton Dickinson által gyártott fluorofór konjugált monoklonális antitestek: CD3-Pacific Blue (klón: 17A2), CD4-PerCP (klón: GK1.5), CD8-APC/Cy7 (klón: YTS156.7.7), CD44-PE (klón: IM7), CD62L-APC (klón: MEL-14). PTE ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézet által gyártott fluorofór konjugált monoklonális antitestek: VD4-Alexa-647 (klón: YTS 191), CD8-FITC (klón: IBL 3/25), CD19-FITC (klón: 1D3).

Trec kópiaszám mérés

A Trec (T cell-recombination excision circle) a T-sejtekben végbemenő génátrendeződés eredményeként keletkezik, jelenléte a perifériára kerülő naiv T-sejtekben is kimutatható. Vizsgálatával megfigyelhetjük a tímusz T-sejt termelő aktivitását [76]. A vizsgálathoz DNS-t izoláltunk egér timocitákból NucleoSpin Tissue kittel (Macherey-Nagel) és humán perifériás vérmintákból DNA Blood Mini kit (Qiagen) használatával. Mindkét esetben a gyártó utasításit követtük. Az abszolút Trec kópiaszámokat digitális PCR technika segítségével határoztuk meg, QuantStudio 3D Digital PCR platform (ThermoFisher) eszköz használatával. A reakciókhoz 30ng DNS mintát használtunk. A Taqman primer próbákat és a reakcióhoz szükséges anyagokat a ThermoFishertől vásároltuk, és a gyártó előírásai szerint használtuk. A humán vérmintákon történt vizsgálatokat a Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ etikai bizottságának engedélyével végeztük (Referencia szám: 6439/2016). A minták forrása: David B. Savage, MD, PhD (Metabolic Research Laboratories, School of Clinical Medicine, University of Cambridge, Cambridge, United Kingdom). Minden résztvevő írásos beleegyezést adott a Helsinki egyezménynek megfelelően. A vizsgálatokban a 40-60 éves korosztályból férfiak és nők egyaránt részt vettek. Az FPLD2 és FPLD3 lipodisztrófiás állapotot genetikai diagnózissal határozták meg.

Orális tolerancia kialakítása egérben

Az orális tolerancia kialakítását és kiértékelését korábban leírt módszer szerint végeztük [77][78][79]. A vad típusú és a PPAR γ haploinsufficiens egerek 5mg/ml ovalbumint (OVA) tartalmazó ívóvizet kaptak 7 napon keresztül. A 7. napon az egereket intraperitoneálisan beoltottunk 5 μ g OVA-val (200 μ l, PBS és komplett Freund-adjuváns 1:1 arányú keverékben oldva). A 14. napon az egereket másodszor is intraperitoneálisan beoltottuk 5 μ g OVA-val

(200 µl, PBS és inkomplett Freund-adjuváns 1:1 arányú keverékben oldva). Az egerek szérum mintáit a 21. napon gyűjtöttük össze. Az OVA elleni IgG antitestek mértékét ELISA módszerrel határoztuk meg. A 96 lyukú Microtest Plate-et (Sarstedt) OVA-val vontuk be, és BSA-val blokkoltuk a nem specifikus kötődéseket. A plate-eket az egér szérumok felező hígítási sorozatával (1:100 – 1:3200) inkubáltuk. Az antitest tartalmat HRP konjugált egér immunglobulin ellenes antitesttel (nyúl poliklonális, Dako) jelenítettük meg. Az optikai denzitást 492 nm-en mértük iEMS Reader MF (Thermo LabSystems) plate olvasó segítségével.

Influenza vakcináció egérben

Az influenza oltás hatékonyságának ellenőrzését Ramirez és munkatársai szerint leírtak alapján végeztük [80]. Röviden, 9 hónapos korban mind a vad típusú, mind a PPAR γ haploinsufficiens egereket intramuszkulárisan beoltottuk egy alkalommal 0,1 ml humán influenza vakcinával (3Fluart), a humán vakcináció modellezése érdekében (a null egerek rendszerint nem élik meg ezt a kort, anyagcsere alapbetegség miatt). Majd 3 hónappal később, az egerek 12 hónapos korában megmértük az egerek szérum mintáinak H1N1 (A/California/7/2009-es törzs, melyet a 3Fluart is tartalmaz) elleni antitest tartalmát ELISA módszerrel, hogy megállapítsuk az oltás hatékonyságát. A méréshez az ELISA plate-eket bevontuk 0,05 µg a H1N1 influenza A törzs HA fehérjével (Recombinant subtype H1N1 A/California/7/2009 His Tag, Life Technologies). A plate-eket az egér szérumok felező hígítási sorozatával (1:50 – 1:1600) inkubáltuk. Az antitest tartalmat HRP konjugált egér immunglobulin elleni antitest (nyúl poliklonális, Dako) segítségével tettük detektálhatóvá. Az optikai denzitást 492 nm-en mértük iEMS Reader MF (Thermo LabSystems) plate olvasó segítségével.

Statisztikai analízis

Vizsgálatainkban a minimum elemszám öt. A méréseket duplikálva végeztük. Az eredmények a mérések átlagát mutatják a szórással együtt. A statisztikai analízist GraphPad Prism szoftverrel végeztük. Statisztikai próbaként T-tesztet, illetve Kolmogorov-Smirnov-tesztet használtunk. A szignifikáns különbségeket csillaggal jeleztük (ns: nem szignifikáns, *: $p \leq 0,05$, **: $p \leq 0,01$, ***: $p \leq 0,001$).

Eredmények

A PPAR γ expressziójának változása az öregedés során

Vizsgálatainkból megállapítottuk, hogy míg a fiatal egér tímuszában alig detektálható a PPAR γ fehérje jelenléte, addig felnőtt egér tímuszában a PPAR γ erőteljes expressziót mutat. Az idős egerekből származó mintákon megfigyeltük a PPAR γ és az EpCAM1 epitél marker együttes expresszióját is ugyanazon sejteken. Az együttes expresszió egy köztes állapotra utalhat, ahol a sejtek még mutatnak sejt felszíni epitél jelleget (EpCAM1), de a magban már megkezdődött a zsírsejt irányú transzdifferentiáció (PPAR γ).

Immunhisztokémiai jelölést végeztünk fiatal, középkorú és idős emberekből származó tímusz mintákon. Azt figyeltük meg, hogy a tímuszban a PPAR γ fehérje mennyisége emberben is emelkedik a kor előrehaladtával. Ez a változás szignifikánsnak mutatkozott a fiatal és a középkorú, illetve fiatal és idős emberek tímusz-mintáinak összehasonlítása esetén.

A PPAR γ hatása a tímusz szerkezetére

Mind egerekben, mind pedig emberekben megfigyelték, hogy az öregedés során a tímusz szerkezete és epitél hálózata felbomlik. A tímusz medulláris állományának aránya lecsökken, mely végül a T-sejt termelés csökkenéséhez vezet [34][31]. Azért, hogy megvizsgáljuk a PPAR γ -nak van-e szerepe a tímusz szövettani szerkezetének felbomlásában, összehasonlítottuk a tímusz kortikális és medulláris kompartmentjének arányát vad típusú, PPAR γ KO és PPAR γ heterozigóta egerekben 1 hónapos és 8 hónapos korban. Vizsgálataink kimutatták, hogy míg a vad típusú egerekben az epitél kompartmentek integritása a kor előrehaladtával felbomlik, addig a PPAR γ KO és PPAR γ heterozigóta egerekben az integritás fennmarad. A kéreg és a medulla állomány területét összehasonlítva, míg a vad típusú egereknél a medulla szignifikáns csökkenését figyelhetjük meg, addig a PPAR γ KO egereknél ugyanez nem detektálható.

A PPAR γ hatása tímusz naiv T-sejt termelésre, és a timociták fejlődésére

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk, a PPAR γ hiánya hatással van-e a tímusz naiv T-sejt termelésére felnőtt korban, megmértük a timociták Trec tartalmát vad, PPAR γ heterozigóta és PPAR γ KO egerekben 1 hónapos és 8 hónapos korban. A Trec a T-sejtekben végbemenő géntrendezés eredményeként keletkezik, mint DNS melléktermék. Mivel a Trec DNS láncok csak naiv T-sejtekben mutathatók ki, így mennyiségükből jól következtethetünk a tímusz T-sejt termelő aktivitására [76]. Digitális qPCR méréseink kimutatták, hogy a timocitákból izolált Trec kópiaszám szignifikánsan magasabb a PPAR γ KO egerekben a vad

típusúakhoz képest. Továbbá kimutatható, hogy a PPAR γ gén már egy alléljának az elvesztése is a Trec kópiaszám szignifikáns emelkedéséhez vezet (dózishatás).

A timocita alcsoportok analízise kimutatta, hogy míg a PPAR γ elvesztése pozitív hatással van a naiv T-sejt termelésre, nem befolyásolja a timocita alcsoportok megoszlását.

A PPAR γ hatása a perifériás T-sejt populációkra felnőtt korban

A perifériás T-sejt populációk eloszlását áramlási citometriás méréssel vizsgáltuk egy éves vad típusú és PPAR γ heterozigóta egerekben. A PPAR γ heterozigóta egerekben a T-sejtek aránya a többi vérbeli sejthez képest nem tér el jelentősen a vad típusú egerekéhez képest. Továbbá megfigyelhető, hogy a PPAR γ egy alléljának elvesztése nem befolyásolja szignifikánsan a CD4 és CD8 csoportok eloszlását a teljes T-sejt populáción belül. Míg a CD4 és CD8 megoszlásban nem tapasztaltunk jelentős különbséget, addig a naiv és memória T-sejtek arányában szignifikáns különbség figyelhető meg. A naiv T-sejtek aránya szignifikáns emelkedést, míg a memória T-sejtek aránya szignifikáns csökkenést mutat a PPAR γ heterozigóta egerekben a vad típusúhoz képest. A memória T-sejteket tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy az effektor memória T-sejtek aránya szignifikánsan alacsonyabb a PPAR γ heterozigóta egerekben. Ezzel szemben a centrális memória T-sejtek aránya nem mutat eltérést a vad típusúhoz képest.

A PPAR γ hatása az immunológiai funkciókra

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a PPAR γ hatással van-e immunológiai funkciókra, további tesztek végeztünk *in vivo* egérmodellen. Egy éves vad típusú és PPAR γ heterozigóta egerekben vizsgáltuk egy testidegen fehérje, az ovalbumin által kiváltott (naiv T-sejteket igénylő) orális tolerancia kialakulását, hogy megvizsgáljuk a PPAR γ hiánya hatással van-e az orális tolerancia kialakításának képességére. Eredményeinkből jól látható, hogy az 1 éves vad típusú egérben alig alakul ki orális tolerancia, viszont a PPAR γ heterozigóta állatokban erőteljes orális tolerancia alakul ki ovalbumin fehérjére nézve.

A humán influenza oltást modellezve azt vizsgáltuk, hogy a PPAR γ hiánya okoz-e eltérést 1 éves egerek oltásra adott immunválaszában. Megfigyeltük, hogy a PPAR γ heterozigóta állatokban magasabb antitest titer termelődött az oltóanyaggal szemben a vad típusúhoz képest (azonban ez az eltérés statisztikailag nem értékelhető pilot jellege miatt).

A PPAR γ hiányállapot hatása a humán immunrendszer öregedésére

A PPAR γ hiányállapot egy emberben is létező ritka (<1/1.000.000) FPLD3 néven ismert (familiáris parciális lipodisztrófia 3-as altípusa) genetikai eredetű anyagcsere betegség [81][82][83]. Egy másik, szintén lipodisztrófiát okozó, de eltérő genetikai háttérű ugyancsak ritka (<1/1.000.000) emberi betegség az FPLD2 (familiáris parciális lipodisztrófia 2-es altípusa), melyben a PPAR γ mutáció helyett lamin mutáció felelős ugyanazon anyagcsere betegség kialakulásáért [83]. Az eltérő genetikai háttér ellenére mindkét ritka betegség lipodisztrófiát okoz, azonban ezeknek a tímusz funkciójára gyakorolt hatását még nem vizsgálták. Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk van-e eltérés az FPLD2 és FPLD3 betegek naiv T-sejt termelésében, PBMC DNS mintából megmértük a Trec kópiaszámot. Megfigyeltük, hogy a PPAR γ -mutáns FPLD3 betegek esetében magasabb a Trec kópiaszám (vagyis a naiv T-sejt termelés), mint a lamin-mutáns FPLD2 betegekben. A Trec kópiaszám PPAR γ érintettség esetében eléri a korcsoport (kb. 50 éves átlagéletkor) normál tartományát (200 kópia/ μ g DNS), míg lamin-érintettség esetében elmarad ettől.

Diszkusszió

Az öregedés az élettel együtt járó természetes folyamat, mely során a szervezet megújuló képessége csökken, a funkciójukat veszített sejtek helyét csökkenő ütemben veszik át újonnan keletkezett megfelelően funkcionáló sejtek, melynek következtében az élettani funkciók hanyatlásnak indulnak. Habár az öregedést nem lehet elkerülni, a modern orvoslásnak és a fejlett társadalmi rendszernek köszönhetően az emberiség várható életkora folyamatosan növekszik [84]. Azért, hogy a hosszabb élettartam ne csak az öregkor meghosszabbítását jelentse, hanem az aktív élettartam megnövekedését is eredményezze, fontosak azok a kutatások, melyeknek célja az öregedés folyamatának megismerése és így az időskori életminőség javítása. A tímusz, más néven csecsemőmirigy egy korán öregedésnek induló szövet, emberben és egérben egyaránt. Hanyatlása már gyermekkorban megkezdődik és a pubertáskorban lejátszódó hormonális változásokkal felgyorsul [76]. Mivel a tímusz nélkülözhetetlen szerepet játszik az immunrendszer T-sejtjeinek termelésében és szelekciójában, funkciójának csökkenése komoly következményekkel jár. Az idős korban gyakrabban előforduló fertőzőes megbetegedések, autoimmun betegségek és tumoros elváltozások összefüggést mutatnak a tímusz naiv T-sejt termelő funkciójának csökkenésével [35]. A tímusz öregedésében, a T-sejt fejlődésben közvetlenül szerepet játszó epitél állomány erősen érintett. Az idő előrehaladtával az epitél hálózat szerkezete felbomlik, az epitél sejtek

száma csökken, helyüket zsírsejtek veszik át. Mivel idős korban a tímusz elzsírosodik és a zsírszövetek megjelenését obligát módon a PPAR γ transzkripciós faktor irányítja, ezért vizsgáltuk a PPAR γ transzkripciós faktor tímusz öregedésben betöltött szerepét.

A tímusz öregedése során végbemenő génexpressziós változásokat már korábban is vizsgálta csoportunk. Tímusz mintákon kimutattuk, hogy a PPAR γ transzkripciós faktor expressziós szintje öregedés során emelkedik az epitél sejtekben [30]. Ezt a megfigyelést, a jelen vizsgálatok is megerősítik. Egér tímusz metszeteken végzett immunfluoreszcens jelöléssel a fiatal, egy hónapos egerek tímuszában a PPAR γ jelenléte még nem figyelhető meg, míg a tímusz szempontjából már idős 15 hónapos egerek tímuszában a PPAR γ fokozott jelenléte volt megfigyelhető. Továbbá kimutattuk, hogy egyes esetekben ugyanazon epitél sejtek felszínén még epitél marker (EpCAM1), míg magjában már zsírsejt-irányú differenciációra utaló (PPAR γ) marker detektálható. Ez megerősíti korábbi feltételezésünket, hogy az öregedés során a tímusz epitél sejtjei transzdifferentiálódnak zsírsejt irányban, mivel a PPAR γ aktivitás a zsírsejt-irányú differenciációt indukálja [58]. Megvizsgáltuk a PPAR γ expresszió korfüggését humán tímuszban is. Immunhisztokémiai jelölést használva megfigyeltük, hogy bár a PPAR γ jelen van a fiatal felnőtt (20-30 éves), a középkorú (50-60 éves) és az idős (70-80 éves) humán tímuszban is, a kor előrehaladtával a PPAR γ expresszió erősödése tapasztalható. A fiatal felnőtt mintákhoz képest a középkorú és az idős minták szignifikánsan erősebb PPAR γ jelenlétet mutattak.

A PPAR γ -val kapcsolatos tanulmányok közt több olyan eredmény is született, mely összefüggést talált a fokozott PPAR γ aktivitás és a csökkent tímusz funkció között. Beszámolnak arról, hogy a PPAR γ -t aktiváló szteroid alapú gyógyszerkészítmények, vagy a PPAR γ agonista TZD-alapú gyógyszerek a tímusz fokozott elzsírosodását okozhatják, ezáltal az immunológiai funkciók csökkenését eredményezhetik. Valamint kimutatták, hogy a PPAR γ fokozott expressziója felgyorsítja a tímusz öregedését [51]. Ezek az eredmények összhangban vannak az általunk megfigyelt, öregedéssel együtt járó PPAR γ expresszió növekedéssel. Ezen eredmények azt sugallják, hogy a PPAR γ aktív szereppel bír a tímusz öregedésének mechanizmusában. Mivel a PPAR γ fokozott expressziójának hatása már ismert, de hiányának hatását még nem vizsgálták a tímusz szempontjából, így a tímusz öregedését PPAR γ hiányállapotú egerekben és emberekben is megvizsgáltuk.

A tímusz szövettani szerkezetét vizsgálva megfigyeltük, hogy vad típusú egérben 8 hónapos korban (mely a tímusz öregedése szempontjából már számottevő kor) a kortikális és medulláris területek aránya megváltozik, az epitél sejtek hálózatának felbomlása megkezdődik. Ezek a degeneratív elváltozások a génhíányos PPAR γ KO, illetve PPAR γ

heterozigóta egerekben nem következnek be. Annak tisztázására, hogy a PPAR γ hiánya a tímusz szerkezetének megőrzése mellett a tímusz funkciójára is hatással van-e, megmértük a naiv T-sejt termelés mértékét Trec digitális qPCR módszerrel. A Trec kópiák olyan cirkuláris DNS molekulák, melyek a T-sejtekben lezajló TCR génátrendeződés melléktermékeként keletkeznek, mennyiségük arányos a naiv T-sejt termelés mértékével. Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy míg vad típusú egérben 8 hónapos korban már enyhe csökkenés figyelhető meg a Trec kópiaszámban fiatal felnőtt korhoz képest, addig a PPAR γ KO és heterozigóta egerekben a Trec kópiaszám szignifikánsan magasabb, dóziszfüggő mértékben. A timocita alcsoportok CD4/CD8 megoszlásának vizsgálatával megfigyeltük, hogy a timocita alcsoportok eloszlását tekintve sem a PPAR γ KO, sem a PPAR γ heterozigóta minták nem mutatnak eltérést a vad típusúhoz képest. Ebből arra következtethetünk, hogy a PPAR γ hiánya, bár megnöveli a keletkező naiv T-sejtek számát, de a timociták fejlődésének irányát nem befolyásolja, az alcsoportok megoszlását nem torzítja.

A fenti eredményeink alapján a PPAR γ funkció elvesztése pozitív hatással van a tímusz szerkezetére és naiv T-sejt termelésére öregedés során. Továbbá azt is megfigyeltük, hogy ez a hatás nem csak a gén teljes hiányában, hanem már egy alléljának elvesztésével is megfigyelhető (dózishatás). A PPAR γ teljes hiánya azonban súlyos anyagcsere betegségekhez vezet egér esetében [74]. Ennek következtében a PPAR γ KO egerek hosszú távú követése (10 hónapon túl) nem kivitelezhető. Ugyanezen súlyos anyagcsere elváltozások azonban a PPAR γ heterozigóta egereknél nem figyelhetők meg. Mivel a PPAR γ heterozigóta egereket nem érinti a PPAR γ hiányának élettartamot és anyagcserét befolyásoló negatív hatási, viszont a tímuszra gyakorolt pozitív hatás kimutatható volt, további kísérleteinket idősebb korban ezekkel az állatokkal végeztük.

Annak érdekében, hogy megvizsgáljuk a fokozott tímusz funkció (naiv T-sejt termelés) befolyásolja-e a perifériás immunrendszer sejtes összetételét, összehasonlítottuk 12 hónapos vad típusú és PPAR γ heterozigóta egerek vérében keringő T-sejt alcsoportok arányát. Kimutattuk, hogy a T-sejtek aránya nem változik a többi limfocita típusúhoz képest, valamint a CD4 és CD8 T-sejtek aránya sem változik a perifériás vérben. Korábbi tanulmányok leírták, hogy öregedés során a naiv T-sejtek aránya csökken, míg a memória T-sejtek aránya emelkedik [35][85]. Részben a naiv T-sejtek arányának csökkenése lehet felelős az idős korban megfigyelt, gyengébb immunológiai válaszáért [35][86][87]. Mivel a PPAR γ hiánya pozitív hatással van a tímusz naiv T-sejt termelésére, megvizsgáltuk, hogy ez hatással van-e a naiv T-sejtek arányára a perifériás vérben. Megfigyeltük, hogy 12 hónapos PPAR γ heterozigóta egerekben a naiv T-sejtek aránya szignifikánsan magasabb, mint a vad típusú 12

hónapos korú egerekben. A memória T-sejt populációt tovább vizsgálva megállapítottuk, hogy míg a centrális memória T-sejtek aránya nem változik, addig az effektor memória T-sejtek aránya alacsonyabb a PPAR γ heterozigóta egerekben a vad típushoz képest 12 hónapos korban.

Az eddig bemutatott eredmények alapján a PPAR γ hiánya késlelteti a tímusz epitél állományának öregedését, pozitív hatással van a naiv T-sejt termelésre és a perifériás vérben megnöveli a naiv T-sejtek arányát. Ezek alapján feltételezhetjük, hogy idősebb korban a naiv T-sejt függő immunológiai funkciók aktívabbak maradnak a PPAR γ génhiányos egerekben, mint kontroll társaikban. Annak érdekében, hogy ezt a feltevést megvizsgáljuk, az orális tolerancia kialakulásának készségét és egy humán oltóanyag hatékonyságát vizsgáltuk 12 hónapos vad típusú és PPAR γ heterozigóta egerekben. Mind a két folyamat naiv T-sejt függő, valamint korábbi tanulmányok kimutatták, hogy idősebb korban csökken mind az oltások hatékonysága és orális (étel)-intolerancia is gyakrabban alakul ki [88][78]. Kimutattuk, hogy míg 12 hónapos korban a vad típusú egerben alig alakul ki orális tolerancia (bár ez fiatal korban könnyen kialakítható [79]), addig a PPAR γ heterozigóta egerekben az orális tolerancia könnyedén kialakul még 12 hónapos korban is. Továbbá az influenza oltás hatékonysága is megmarad idősebb PPAR γ heterozigóta egerekben, míg vad típus esetében ez jelentősen gyengébb. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy a tímuszra és azon belül a naiv T-sejt termelésre gyakorolt kedvező hatása révén a PPAR γ hiánya pozitív hatással van a T-sejt függő immunológiai funkciókra idősebb korban.

Egér modellen kimutatott eredményeink humán vonatkozásait is megvizsgáltuk. A PPAR γ génhiányos állapot (III-as típusú familiáris parciális lipodisztrófia) egy ismert ritka betegség (1/1.000.000) emberben is. Bár a betegség által okozott súlyos anyagcsere problémákat több klinikai kutatás is kimutatta [71][72], a PPAR γ hiányállapot immunrendszerre gyakorolt hatását azonban még nem vizsgálták. Mivel a járulékos anyagcsere problémák is csökkent immunológiai funkciókhoz vezethetnek és középkorú (már nem fiatal) betegekről van szó, eredményeinket a hasonló korú és hasonló anyagcsere problémákat eredményező, de a PPAR γ -t nem érintő lamin mutáción alapuló FPLD2 betegségben [67] szenvedő emberekhez hasonlítottuk. Megfigyeltük, hogy FPLD3 betegek vérében magasabb a Trec kópiaszám, mint a korban és betegségben megegyező FPLD2 betegek esetében, és megfelel az életkor alapján várható értéknek. Ezek alapján arra következtethetünk, hogy az emberi PPAR γ hiányállapot az egerekhez hasonlóan pozitív hatással van a tímusz funkcióra idősebb korban.

Vizsgálatainkkal kimutattuk, hogy a PPAR γ hiánya egerekben késlelteti a tímusz öregedését. A PPAR γ gén már egy alléljának hiánya is azt eredményezi, hogy a tímusz epitél hálózatának

felbomlása később kezdődjön meg vad típusú egerekhez képest. A jelenség pozitív következménye a fokozott naiv T-sejt termelés és a hatékonyabb T-sejt függő immunológiai funkciók PPAR γ génhiányos egerekben. Ezt a pozitív hatást humán vonatkozásban is sikerült igazolni PPAR γ hiányállapotú betegekben. Bár a PPAR γ hiányállapot az immunrendszerre pozitív hatást gyakorol, emellett súlyos anyagcsere problémákat is okoz, ami miatt a szisztémás PPAR γ gátlás nem lenne alkalmazható a tímusz öregedésének késleltetése érdekében. Ezért további célunk olyan mechanizmus azonosítása, mely genetikai (szisztémás) hatás helyett célzottan a tímusz epitélre kifejtett PPAR γ antagonistá hatást közvetítene. Jelen tudásunk és párhuzamos kutatási eredményeink alapján céljainkra mesterséges nanorészecskék vagy exoszómák lehetnek alkalmasak, de ennek részletezése túlmutat a jelen dolgozaton.

Új eredmények összefoglalása

1. Kimutattuk, hogy PPAR γ génhiányos egerekben a tímusz szerkezetének öregedéssel együtt járó változásai később játszódnak le a vad típusúhoz képest. Azt is megfigyeltük, hogy ez a késleltetés dózisfüggő, már a PPAR γ egyetlen alléljának hiányában is végbemegy, nem csak a PPAR γ teljes hiányában.
2. Bebizonyítottuk, hogy a PPAR γ hiánya hatással van a naiv T-sejt termelésre. Nyolc hónapos korban jelentősen magasabb volt a naiv T-sejt termelés PPAR γ génhiányos egerekben, mint vad típusú társaikban. Megfigyeltük, hogy ez a jelenség szintén dózisfüggő, mivel a PPAR γ heterozigóta egerekben a T-sejt termelés magasabb volt a vad típusnál, de alacsonyabb a PPAR γ KO egereknél.
3. Megfigyeltük, hogy egereknél a tímusz szempontjából idősnek számító egy éves korban a PPAR γ hiánya befolyásolja a naiv T-sejtek arányát perifériás vérben. A naiv T-sejt/memória T-sejt arány a naiv T-sejtek javára tolódik el a PPAR γ heterozigóta egerekben vad típusú társaikhoz viszonyítva.
4. A naiv T-sejtek arányának növekedése hatást gyakorol a T-sejt függő immunológiai funkciókra. *In vivo* kísérletekkel kimutattuk, hogy az orális tolerancia kialakulása, valamint a vakcinálhatóság fokozott hatékonysággal ment végbe egy éves PPAR γ heterozigóta egerekben, vad típusú társaikhoz képest.

5. Végül bizonyítást nyert, hogy az immunrendszer, azon belül is a tímusz öregedéséről egér modellben nyert eredményeink humán jelentőséggel is bírnak. A ritka spontán PPAR γ hiányállapottal (FPLD3 betegség) rendelkező betegek esetében felnőtt korban fokozottabb a tímusz funkciója (naiv T-sejt termelés), mint azonos korú és betegségű egyéb genetikai háttérrel rendelkező betegek esetében (FPLD2 betegség, lamin mutáció következtében).

Irodalomjegyzék

- [1] X. Jiang, D. H. Rowitch, P. Soriano, A. P. McMahon, and H. M. Sucov, "Fate of the mammalian cardiac neural crest.," *Development*, vol. 127, no. 8, pp. 1607–1616, 2000.
- [2] M. Itoi, H. Kawamoto, Y. Katsura, and T. Amagai, "Two distinct steps of immigration of hematopoietic progenitors into the early thymus anlage," *Int. Immunol.*, vol. 13, no. 9, pp. 1203–1211, 2001.
- [3] S. W. Rossi, W. E. Jenkinson, G. Anderson, and E. J. Jenkinson, "Clonal analysis reveals a common progenitor for thymic cortical and medullary epithelium," *Nature*, vol. 441, no. 7096, pp. 988–991, 2006.
- [4] D. H. D. Gray *et al.*, "Developmental kinetics, turnover, and stimulatory capacity of thymic epithelial cells," *Blood*, vol. 108, no. 12, pp. 3777–3785, 2006.
- [5] W. van Ewijk, E. W. Shores, and A. Singer, "Crosstalk in the mouse thymus," *Trends Immunol.*, vol. 15, no. 5, pp. 214–217, 1994.
- [6] I. Ohigashi, M. Kozai, and Y. Takahama, "Development and developmental potential of cortical thymic epithelial cells," *Immunol. Rev.*, vol. 271, no. 1, pp. 10–22, 2016.
- [7] M. Nehls, D. Pfeifer, M. Schorpp, H. Hedrich, and T. Boehm, "New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations," *Nature*, vol. 372, no. 6501, pp. 103–107, 1994.
- [8] H. Takaba and H. Takayanagi, "The Mechanisms of T Cell Selection in the Thymus," *Trends in Immunology*, vol. 38, no. 11, pp. 805–816, 2017.
- [9] S. W. Rossi *et al.*, "RANK signals from CD4⁺ 3⁻ inducer cells regulate development of Aire-expressing epithelial cells in the thymic medulla," *J. Exp. Med.*, vol. 204, no. 6, pp. 1267–1272, 2007.
- [10] E. F. Lind, S. E. Prockop, H. E. Porritt, and H. T. Petrie, "Mapping precursor movement through the postnatal thymus reveals specific microenvironments supporting defined stages of early lymphoid development.," *J. Exp. Med.*, vol. 194, no. 2, pp. 127–134, 2001.
- [11] J. C. Zúñiga-Pflücker, "When three negatives made a positive influence in defining four early steps in T cell development.," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 9, pp. 4201–2, Nov. 2012.
- [12] M. Ciofani and J. C. Zúñiga-Pflücker, "The Thymus as an Inductive Site for T Lymphopoiesis," *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, vol. 23, no. 1, pp. 463–493, 2007.
- [13] T. Hara *et al.*, "Identification of IL-7-Producing Cells in Primary and Secondary Lymphoid Organs Using IL-7-GFP Knock-In Mice," *J. Immunol.*, vol. 189, no. 4, pp. 1577–1584, 2012.
- [14] K. Hozumi *et al.*, "Delta-like 4 is indispensable in thymic environment specific for T cell development," *J. Exp. Med.*, vol. 205, no. 11, pp. 2507–2513, 2008.
- [15] M. Ciofani and J. C. Zúñiga-Pflücker, "Determining $\gamma\delta$ versus $\alpha\beta$ T cell development (mouse)," *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 10, no. 9, pp. 657–663, 2010.
- [16] H. R. MacDonald, R. C. Budd, and R. C. Howe, "A CD3⁻ subset of CD4⁺ 8⁺ thymocytes: a rapidly cycling intermediate in the generation of CD4⁺ 8⁺ cells.," *Eur. J. Immunol.*, vol. 18, pp. 519–523, 1988.
- [17] A. Singer, S. Adoro, and J. H. Park, "Lineage fate and intense debate: Myths, models and mechanisms of CD4⁻ versus CD8⁻ lineage choice," *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 10, pp. 788–801, 2008.
- [18] S. Murata *et al.*, "Regulation of CD8⁺ T Cell Development by Thymus-Specific Proteasomes," *Science (80-.)*, vol. 316, no. 5829, pp. 1349–1353, 2007.
- [19] K. Takada and Y. Takahama, "Positive-selection-inducing self-peptides displayed by cortical thymic epithelial cells," *Adv. Immunol.*, vol. 125, no. 1, pp. 87–110, 2015.
- [20] G. Anderson and Y. Takahama, "Thymic epithelial cells: Working class heroes for T cell development

- and repertoire selection,” *Trends in Immunology*, vol. 33, no. 6. pp. 256–263, 2012.
- [21] R. Förster, A. C. Davalos-Miszlitz, and A. Rot, “CCR7 and its ligands: Balancing immunity and tolerance,” *Nature Reviews Immunology*, vol. 8, no. 5. pp. 362–371, 2008.
- [22] L. Klein, B. Kyewski, P. M. Allen, and K. A. Hogquist, “Positive and negative selection of the T cell repertoire: What thymocytes see (and don’t see),” *Nature Reviews Immunology*, vol. 14, no. 6. pp. 377–391, 2014.
- [23] C. St-Pierre, A. Trofimov, S. Brochu, S. Lemieux, and C. Perreault, “Differential Features of AIRE-Induced and AIRE-Independent Promiscuous Gene Expression in Thymic Epithelial Cells,” *J. Immunol.*, vol. 195, no. 2, pp. 498–506, 2015.
- [24] S. Sakaguchi, “Regulatory T cells: Key controllers of immunologic self-tolerance,” *Cell*, vol. 101, no. 5. pp. 455–458, 2000.
- [25] K. G. Flores, J. Li, G. D. Sempowski, B. F. Haynes, and L. P. Hale, “Analysis of the human thymic perivascular space during aging,” *J. Clin. Invest.*, vol. 104, no. 8, pp. 1031–1039, 1999.
- [26] H. Yang *et al.*, “Axin expression in thymic stromal cells contributes to an age-related increase in thymic adiposity and is associated with reduced thymopoiesis independently of ghrelin signaling,” *J. Leukoc. Biol.*, vol. 85, no. 6, pp. 928–38, Jun. 2009.
- [27] R. A. Miller, “The Aging Immune System: Primer and Prospectus,” *Science (80-.)*, vol. 273, no. 5271, pp. 70–74, 1996.
- [28] B. F. Haynes, M. L. Markert, G. D. Sempowski, D. D. Patel, and L. P. Hale, “The Role of the Thymus in Immune Reconstitution in Aging, Bone Marrow Transplantation, and HIV-1 Infection,” *Annu. Rev. Immunol.*, vol. 18, no. 1, pp. 529–560, 2000.
- [29] N. R. Manley, E. Richie, C. C. Blackburn, B. G. Condie, and J. Sage, “Structure and function of the thymic microenvironment,” *Front. Biosci.*, vol. 17, no. June, pp. 2461–2477, 2011.
- [30] H. Yang, Y.-H. Y.-H. Youm, and V. D. Dixit, “Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution,” *J. Immunol.*, vol. 183, no. 5, pp. 3040–3052, Sep. 2009.
- [31] A. V. Griffith, M. Fallahi, T. Venables, and H. T. Petrie, “Persistent degenerative changes in thymic organ function revealed by an inducible model of organ regrowth,” *Aging Cell*, vol. 11, no. 1, pp. 169–177, 2012.
- [32] V. D. M. Coelho *et al.*, “Fat-storing multilocular cells expressing CCR5 increase in the thymus with advancing age: Potential role for CCR5 ligands on the differentiation and migration of preadipocytes,” *Int. J. Med. Sci.*, vol. 7, no. 1, pp. 1–14, 2010.
- [33] Y. H. Youm *et al.*, “Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity,” *J. Biol. Chem.*, vol. 284, no. 11, pp. 7068–7077, Mar. 2009.
- [34] D. D. Taub and D. L. Longo, “Insights into thymic aging and regeneration,” *Immunological Reviews*, vol. 205. pp. 72–93, 2005.
- [35] K. Naylor *et al.*, “The Influence of Age on T Cell Generation and TCR Diversity,” *J. Immunol.*, vol. 174, no. 11, pp. 7446–7452, 2005.
- [36] J. Gui, X. Zhu, J. Dohkan, L. Cheng, P. F. Barnes, and D. M. Su, “The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells,” *Int. Immunol.*, vol. 19, no. 10, pp. 1201–1211, 2007.
- [37] D. M. Su, S. Navarre, W. J. Oh, B. G. Condie, and N. R. Manley, “A domain of Foxn1 required for crosstalk-dependent thymic epithelial cell differentiation,” *Nat. Immunol.*, vol. 4, no. 11, pp. 1128–1135, 2003.
- [38] N. Bredenkamp, S. Ulyanchenko, K. E. O’Neill, N. R. Manley, H. J. Vaidya, and C. C. Blackburn, “An organized and functional thymus generated from FOXN1-reprogrammed fibroblasts,” *Nat. Cell Biol.*, vol. 16, no. 9, pp. 902–908, 2014.
- [39] A. M. Farley *et al.*, “Dynamics of thymus organogenesis and colonization in early human development,” *Development*, vol. 140, no. 9, pp. 2015–26, May 2013.
- [40] G. Balciunaite *et al.*, “Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice,” *Nat. Immunol.*, vol. 3, no. 11, pp. 1102–1108, 2002.
- [41] C. C. Blackburn and N. R. Manley, “Developing a new paradigm for thymus organogenesis,” *Nat. Rev. Immunol.*, vol. 4, no. 4, pp. 278–289, 2004.
- [42] C. L. Ortman, K. A. Dittmar, P. L. Witte, and P. T. Le, “Molecular characterization of the mouse involuted thymus: Aberrations in expression of transcription regulators in thymocyte and epithelial compartments,” *Int. Immunol.*, vol. 14, no. 7, pp. 813–822, 2002.
- [43] K. Kvell *et al.*, “Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence,” *PLoS One*, vol. 5, no. 5, 2010.
- [44] L. Cheng *et al.*, “Postnatal tissue-specific disruption of transcription factor FoxN1 triggers acute thymic

- atrophy,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 8, pp. 5836–5847, 2010.
- [45] L. Sun, J. Guo, R. Brown, T. Amagai, Y. Zhao, and D. M. Su, “Declining expression of a single epithelial cell-autonomous gene accelerates age-related thymic involution,” *Aging Cell*, vol. 9, no. 3, pp. 347–357, 2010.
- [46] J. Pongracz, K. Hare, B. Harman, G. Anderson, and E. J. Jenkinson, “Thymic epithelial cells provide Wnt signals to developing thymocytes,” *Eur. J. Immunol.*, vol. 33, no. 7, pp. 1949–1956, 2003.
- [47] I. Louis, K. M. Heinonen, J. Chagraoui, S. Vainio, G. Sauvageau, and C. Perreault, “The Signaling Protein Wnt4 Enhances Thymopoiesis and Expands Multipotent Hematopoietic Progenitors through β -Catenin-Independent Signaling,” *Immunity*, vol. 29, no. 1, pp. 57–67, 2008.
- [48] F. Weerkamp *et al.*, “Wnt signaling in the thymus is regulated by differential expression of intracellular signaling molecules,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 103, no. 9, pp. 3322–3326, 2006.
- [49] J. S. Sutherland *et al.*, “Activation of Thymic Regeneration in Mice and Humans following Androgen Blockade,” *J. Immunol.*, vol. 175, no. 4, pp. 2741–2753, 2005.
- [50] D. B. Palmer, “The effect of age on thymic function,” *Front. Immunol.*, vol. 4, p. 316, Jan. 2013.
- [51] Y.-H. H. Youm, H. Yang, R. Amin, S. R. Smith, T. Leff, and V. D. Dixit, “Thiazolidinedione treatment and constitutive-PPAR γ activation induces ectopic adipogenesis and promotes age-related thymic involution,” *Aging Cell*, vol. 9, no. 4, pp. 478–89, Aug. 2010.
- [52] H. Sato *et al.*, “The effect of sex hormones on peroxisome proliferator-activated receptor gamma expression and activity in mature adipocytes,” *Biol. Pharm. Bull.*, vol. 36, no. 4, pp. 564–73, 2013.
- [53] M. Ahmadian *et al.*, “Ppar γ signaling and metabolism: The good, the bad and the future,” *Nat. Med.*, vol. 19, no. 5, pp. 557–566, 2013.
- [54] L. la C. Poulsen, M. Siersbæk, and S. Mandrup, “PPARs: Fatty acid sensors controlling metabolism,” *Seminars in Cell and Developmental Biology*, vol. 23, no. 6, pp. 631–639, 2012.
- [55] R. M. Evans, G. D. Barish, and Y. X. Wang, “PPARs and the complex journey to obesity,” *Nature Medicine*, vol. 10, no. 4, pp. 355–361, 2004.
- [56] P. Tontonoz and B. M. Spiegelman, “Fat and Beyond: The Diverse Biology of PPAR γ ,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 77, no. 1, pp. 289–312, 2008.
- [57] G. Medina-Gomez *et al.*, “PPAR gamma 2 prevents lipotoxicity by controlling adipose tissue expandability and peripheral lipid metabolism,” *PLoS Genet.*, vol. 3, no. 4, pp. 0634–0647, 2007.
- [58] Y. Barak *et al.*, “PPAR γ is required for placental, cardiac, and adipose tissue development,” *Mol. Cell*, vol. 4, no. 4, pp. 585–595, 1999.
- [59] T. Imai *et al.*, “Peroxisome proliferator-activated receptor {gamma} is required in mature white and brown adipocytes for their survival in the mouse,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 101, no. 13, pp. 4543–4547, 2004.
- [60] I. Szatmari, E. Rajnavolgyi, and L. Nagy, “PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function,” *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 1088, pp. 207–18, 2006.
- [61] a Chawla, Y. Barak, L. Nagy, D. Liao, P. Tontonoz, and R. M. Evans, “PPAR-gamma dependent and independent effects on macrophage-gene expression in lipid metabolism and inflammation,” *Nat. Med.*, vol. 7, no. 1, pp. 48–52, 2001.
- [62] D. Cipolletta *et al.*, “PPAR- γ is a major driver of the accumulation and phenotype of adipose tissue T reg cells,” *Nature*, vol. 486, no. 7404, pp. 549–553, 2012.
- [63] A. Garg, “Lipodystrophies,” *Am J Med*, vol. 108, no. 2, pp. 143–152, 2000.
- [64] A. Garg, “Lipodystrophies: Genetic and acquired body fat disorders,” *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, vol. 96, no. 11, pp. 3313–3325, 2011.
- [65] A. Garg, R. M. Peshock, and J. L. Fleckenstein, “Adipose tissue distribution pattern in patients with familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety),” *J Clin Endocrinol Metab*, vol. 84, no. 1, pp. 170–4, 1999.
- [66] a Garg, “Gender differences in the prevalence of metabolic complications in familial partial lipodystrophy (Dunnigan variety),” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 85, no. 5, pp. 1776–1782, 2000.
- [67] S. Shackleton *et al.*, “LMNA, encoding lamin A/C, is mutated in partial lipodystrophy,” *Nat. Genet.*, vol. 24, no. 2, pp. 153–156, 2000.
- [68] K. Miehle *et al.*, “Novel peroxisome proliferator-activated receptor gamma mutation in a family with familial partial lipodystrophy type 3,” *Clin. Endocrinol. (Oxf)*, vol. 84, no. 1, pp. 141–148, 2016.
- [69] T. Nolis, “Exploring the pathophysiology behind the more common genetic and acquired lipodystrophies,” *Journal of Human Genetics*, vol. 59, no. 1, pp. 16–23, 2014.
- [70] A. K. Agarwal and A. Garg, “A Novel Heterozygous Mutation in Peroxisome Proliferator-Activated Receptor- γ Gene in a Patient with Familial Partial Lipodystrophy,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 87, no. 1, pp. 408–408, 2002.
- [71] R. K. Semple, V. K. K. Chatterjee, and S. O. Rahilly, “PPAR γ and human metabolic disease,” *J. Clin. Invest.*, vol. 116, no. 3, pp. 581–589, 2006.

- [72] E. Lau, D. Carvalho, J. Oliveira, S. Fernandes, and P. Freitas, "Familial partial lipodystrophy type 3: A new mutation on the PPARG gene," *Hormones*, vol. 14, no. 2, pp. 317–320, 2015.
- [73] M. Auclair *et al.*, "Peroxisome proliferator-activated receptor- γ mutations responsible for lipodystrophy with severe hypertension activate the cellular renin-angiotensin system," *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, vol. 33, no. 4, pp. 829–838, 2013.
- [74] K. Nadra *et al.*, "PPAR γ in placental angiogenesis," *Endocrinology*, vol. 151, no. 10, pp. 4969–4981, Oct. 2010.
- [75] J. Shu, G. E. Dolman, J. Duan, G. Qiu, and M. Ilyas, "Statistical colour models: An automated digital image analysis method for quantification of histological biomarkers," *Biomed. Eng. Online*, 2016.
- [76] H. E. Lynch, G. L. Goldberg, A. Chidgey, M. R. M. Van den Brink, R. Boyd, and G. D. Sempowski, "Thymic involution and immune reconstitution.," *Trends Immunol.*, vol. 30, no. 7, pp. 366–73, Jul. 2009.
- [77] P. U. Simioni, L. G. R. Fernandes, D. L. Gabriel, and W. M. S. C. Tamashiro, "Induction of systemic tolerance in normal but not in transgenic mice through continuous feeding of ovalbumin," *Scand. J. Immunol.*, vol. 60, no. 3, pp. 257–266, Sep. 2004.
- [78] A. M. C. De Faria *et al.*, "Aging affects oral tolerance induction but not its maintenance in mice," *Mech. Ageing Dev.*, vol. 102, no. 1, pp. 67–80, 1998.
- [79] H. Kato *et al.*, "Lack of oral tolerance in aging is due to sequential loss of Peyer's patch cell interactions," *Int. Immunol.*, vol. 15, no. 2, pp. 145–158, 2003.
- [80] A. Ramirez, M. Co, and A. Mathew, "CpG improves influenza vaccine efficacy in young adult but not aged mice," *PLoS One*, vol. 11, no. 3, 2016.
- [81] R. A. Hegele, "Familial partial lipodystrophy: A monogenic form of the insulin resistance syndrome," *Molecular Genetics and Metabolism*, vol. 71, no. 4, pp. 539–544, 2000.
- [82] R. a Hegele, T. R. Joy, S. a Al-Attar, and B. K. Rutt, "Thematic review series: Adipocyte Biology. Lipodystrophies: windows on adipose biology and metabolism.," *J. Lipid Res.*, vol. 48, no. 7, pp. 1433–44, 2007.
- [83] M. C. Vantyghem *et al.*, "How to diagnose a lipodystrophy syndrome," *Annales d'Endocrinologie*, vol. 73, no. 3, pp. 170–189, 2012.
- [84] E. M. Crimmins, "Lifespan and healthspan: Past, present, and promise," *Gerontologist*, vol. 55, no. 6, pp. 901–911, 2015.
- [85] J. Xie *et al.*, "The influences of age on T lymphocyte subsets in C57BL/6 mice," *Saudi J. Biol. Sci.*, vol. 24, no. 1, pp. 108–113, 2017.
- [86] B. R. Becklund *et al.*, "The aged lymphoid tissue environment fails to support naïve T cell homeostasis," *Sci. Rep.*, vol. 6, no. 1, p. 30842, 2016.
- [87] S. Rane, T. Hogan, B. Seddon, and A. J. Yates, "Age is not just a number: Naïve T cells increase their ability to persist in the circulation over time," *PLoS Biol.*, vol. 16, no. 4, 2018.
- [88] K. Haq and J. E. McElhaney, "Immunosenescence: influenza vaccination and the elderly," *Curr. Opin. Immunol.*, vol. 29, pp. 38–42, Aug. 2014.

Publikációk jegyzéke

Az értekezés alapját képező publikáció

Ernszt D, Banfai K, Kellermayer Z, Pap A, Lord JM, Pongracz JE, Kvell K. *PPAR γ gamma Deficiency Counteracts Thymic Senescence*. *Front Immunol*. 2017 Nov 6;8:1515. doi: 10.3389/fimmu.2017.01515. eCollection 2017.

Impakt faktor: **5,551**

Független citáció: 2

Egyéb eredeti publikációk

Barabás K, Godó S, **Ernszt D**, Pál J, Lengyel F, Abraham I. *Rapid non-classical effects of steroids on the membrane receptor dynamics and downstream signaling in neurons*, *Hormones and Behavior*. 2018. IF: 4,418

Bodó K, **Ernszt D**, Németh P, Engelmann P. *Distinct immune- and defense-related molecular fingerprints in separated coelomocyte subsets in Eisenia andrei earthworms*. Invertebrate Survival Journal 15 pp. 338-345., 2018 IF: 0,806

Ugor E, Prenek L, Pap R, Berta G, **Ernszt D**, Najbauer J, Németh P, Boldizsár F, Berki T. *Glucocorticoid hormone treatment enhances the cytokine production of regulatory T cells by upregulation of Foxp3 expression*. Immunobiology. 2018 Apr - May;223(4-5):422-431. doi: 10.1016/j.imbio.2017.10.010. Epub 2017 Oct 6. IF: 2,873

Lipták N, Hoffmann OI, Kerekes A, Iski G, **Ernszt D**, Kvell K, Hiripi L, Bősze Z. *Monitoring of Venus transgenic cell migration during pregnancy in non-transgenic rabbits*. Transgenic Res. 2017 Apr;26(2):291-299. doi: 10.1007/s11248-016-9994-9. Epub 2016 Nov 10. IF: 2,197

Payrits M, Ságghy É, Szolcsányi J, Pohóczky K, Csekő K, Böleskei K, Barabás K, **Ernszt D**, Ábrahám I, Helyes Zs, Szőke É: *Estradiol sensitises the Transient Receptor Potential Vanilloid 1 channel in pain responses*. Endocrinology. 2017. IF: 3,961

Dülk M, Kudlik G, Fekete A, **Ernszt D**, Kvell K, Pongrácz JE, Merő BL, Szeder B, Radnai L, Geiszt M, Csécsy DE, Kovács T, Uher F, Lányi Á, Vas V, Buday L. *The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages*. Sci Rep. 2016 Oct 6;6:34280. doi: 10.1038/srep34280. IF: 4,259

Engelmann P, Hayashi Y, Bodó K, **Ernszt D**, Somogyi I, Steib A, Orbán J, Pollák E, Nyitrai M, Németh P, Molnár L. *Phenotypic and functional characterization of earthworm coelomocyte subsets: Linking light scatter-based cell typing and imaging of the sorted populations*. Dev Comp Immunol. 2016 Dec;65:41-52. doi: 10.1016/j.dci.2016.06.017. Epub 2016 Jun 24. IF: 3,218

Vojkovic D, Kellermayer Z, Heidt D, Mihalj M, Kajtár B, **Ernszt D**, Kovács T, Németh P, Balogh P. *Isolation and Characterization of a Murine Spontaneous High-Grade Follicular Lymphoma with Restricted In Vivo Spreading--a Model for Lymphatic Metastasis Via the Mesentery*. Pathol Oncol Res. 2016 Apr;22(2):421-30. doi: 10.1007/s12253-015-0025-6. Epub 2015 Nov 19. IF: 1,736

Kovacs T, Csongei V, Feller D, **Ernszt D**, Smuk G, Sarosi V, Jakab L, Kvell K, Bartis D, Pongracz JE. *Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence*. Aging Cell. 2014 Oct;13(5):838-49. doi: 10.1111/accel.12240. Epub 2014 Jul 1. IF: 6,340

Impakt faktor: **29,808**

Összes független citáció: 26

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretném kifejezni köszönetemet mindazoknak, akik az elmúlt években segítségükkel hozzájárultak dolgozatom elkészüléséhez.

Elsősorban köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Kvell Krisztiánnak. Hálás vagyok, hogy mindvégig támogatott és szakmai tanácsaival, útmutatásaival segítségemre volt az elmúlt évek során. Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Pongrácz Juditnak, hogy biztosította a körülményeket kutatómunkámhoz és támogatott doktori tanulmányim elvégzésében.

Köszönettel tartozom a Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet valamennyi munkatársának a munkám során nyújtott segítségükért, és a pozitív munkahelyi légkörért, ami megkönnyítette feladataim elvégzését. Külön köszönet jár Bánfai Krisztinának a kísérletek elvégzésében nyújtott segítségéért.

Köszönetet szeretnék mondani Prof. Dr. Balogh Péternek és Dr. Kellermayer Zoltánnak az évek során nyújtott szakmai segítségükért és baráti tanácsaikért. Valamint köszönet illeti az Immunológiai és Biotechnológia Intézet minden dolgozóját, akik szakmai tapasztalatukkal segítettek tanulmányaim során.

Köszönet illeti a Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet dolgozóit, amiért bátran fordulhattam hozzájuk segítségért és szakmai tanácsért.

Külön köszönet jár barátaimnak Dr. Kovács Tamásnak, Dr. Szappanos Dánielnek, Kiss Máténak és Feller Diának, hogy a kezdetek óta mellettem álltak és kitartásra buzdítottak a nehéz pillanatokban, továbbá kiváló szakmai segítségükkel is hozzájárultak dolgozatom elkészültéhez.

Köszönöm szüleimnek, nagyszüleimnek és testvéremnek, azt a támogatást, családi légkört és szeretetet mely lehetővé tette tanulmányaim elvégzését. Nélkülük ez a dolgozat nem születhetett volna meg.

Szavakkal el sem tudom mondani, mennyire hálás vagyok feleségemnek, Majának azért a sokévnnyi segítségért, ösztönzésért, kitartásért és türelemért, amit irántam tanúsított. Köszönöm neki a végtelen szeretetet, mely biztos támaszt nyújtott munkám során. És végül köszönöm kisfiamnak, Mirónak, hogy az elmúlt hónapokban erőt adott, és a dolgozat megírására ösztönzött.