

MTA DOKTORI ÉRTEKEZÉS

**A tímusz életciklusát befolyásoló  
molekuláris célpontok azonosítása, gyógyszerészi  
biotechnológiai alkalmazás fejlesztése**

Dr. Kvell Krisztián



Pécsi Tudományegyetem  
Gyógyszerésztudományi Kar  
Gyógyszerészi Biotechnológia Intézet

**2023**

kvell.krisztian\_95\_23

ORVOSI TUDOMÁNYOK OSZTÁLYA  
GYÓGYSZERÉSZI BIOTECHNOLÓGIA SZAKTERÜLET

# TARTALOM

Rövidítésjegyzék.....	7
Bevezetés .....	9
Irodalmi áttekintés .....	11
A tímusz öregedése és zsíros involúciója emberben .....	11
A Wnt jelátvitel szerepe és jelentősége a tímuszban .....	13
A PPAR molekulacsalád és jelentősége a tímuszban.....	14
Exoszómák és jelentőségük a tímuszban.....	16
Célkitűzések.....	19
Elméleti célkitűzések.....	19
Módszertani célkitűzések .....	19
Anyag és módszer.....	21
Lentivirális vektorok termelése .....	21
Sejtvonalak transzfekciója lentivirális vektorokkal.....	21
Sejtvonalak .....	21
Kísérleti egerek.....	21
Kísérleti egerek cuprizon kezelése .....	22
Beteg eredetű tímusz minták .....	22
Egér és emberi, tímusz sejtek és tímusz minták szövettani festése.....	22
Egér sejtek áramlási citometriás vizsgálata.....	24
Orális tolerancia keltése egérben.....	24
Influenza vakcinálás egérben.....	25
<i>Ex vivo</i> egér tímusz lebeny kísérletek.....	25
Kígyómérgek .....	25
Sejtek és egerek szteroid kezelése.....	26
Egér zigóta izolálása, perivitellin injekció, implantáció.....	26
<i>In vivo</i> fluoreszcens képalkotás .....	26
Transzgenikus sejtek, szövetek és állatok.....	27
Transzmissziós elektronmikroszkópia.....	27
Az eGFP szövettani detektálása.....	27
Az eGFP áramlási citometriás detektálása.....	28
Tímusz epitél sejtek szétválasztása és dúsítása .....	28

Emberi porcsejtes kísérletsorozat .....	28
RNS, cDNS készítés, qPCR analízis .....	29
TaqMan Array alkalmazása .....	30
hTREC kópiaszám meghatározása digitális PCR használatával .....	30
Anyagcsere profil meghatározása .....	30
NTA protokoll .....	31
Vezikulák jelölése és kiértékelése .....	31
Totál RNS izolálása exoszómákból és teljes miRNome analízis .....	31
miRNS target predikció és útvonal analízis .....	32
Vizsgálati alanyok az életmódváltó programban .....	32
Kombinált állóképességi és statikus edzési program .....	33
Mérések az életmódváltó program alanyain .....	33
Vérminták gyűjtése és kiértékelése az életmódváltó programban .....	34
Mesterséges neuronhálózatos adatelemzés .....	34
Élettani és molekuláris adatok biostatistikai kiértékelése .....	34
Statisztikai analízis .....	35
Eredmények és megbeszélés .....	37
Funkcionális kormeghatározás .....	37
Az organogenezis molekuláris tényezői .....	39
Az öregedés jelátviteli tényezői .....	42
Endogén zsíros involúció .....	44
A zsíros involúció 'beige' zsírszövetet eredményez .....	46
A zsíros involúció sebességét befolyásoló tényezők .....	49
Az életmód hatása a tímusz öregedésére .....	54
Wnt4 autokrin hurok jelenléte malignus tímusz daganatok esetében .....	56
A PPARgamma útvonal hatása a szövetkörnyezet függvényében .....	58
Szöveti szelektivitás elérése GM vezikulák, szilika nano-gyöngy, LNP használata révén ....	63
Tímusz-szelektív, regenerogén exoszómák termelése bioreaktorban .....	66
Összefoglalás .....	69
Jövőbeli tervek .....	77
Tézisek felsorolása .....	79
Elméleti felfedezések .....	79
Módszertani újítások .....	80
Köszönetnyilvánítás .....	81

Az értekezéshez felhasznált közlemények felsorolása .....	83
Az értekezéshez felhasznált könyvfejezetek felsorolása .....	87
Az értekezések alapján szerzett PhD fokozatok felsorolása.....	89
Nemzetközi konferencia-részvételek felsorolása.....	91
Nyertes pályázatok felsorolása .....	93
Egyetemi találmányok felsorolása .....	95
Nemzetközi tanulmányutak felsorolása .....	97
Szcientometria (MTMT).....	99
Irodalomjegyzék .....	101
Mellékletek .....	125
Az értekezéshez felhasznált közlemények .....	125
Az értekezéshez felhasznált könyvfejezetek .....	177
Kiemelkedő hivatkozottsági számú publikációk .....	185

*„A tudás megszerzéséhez tanulni kell, a bölcsességhez  
azonban a megfigyelésen át vezet az út.”*

*Marylin vos Savant*

kvell.krisztian\_95\_23

## RÖVIDÍTÉSJEGYZÉK

**ADRP** – adipocyte differentiation related protein

**ANN** – artificial neural network

**Bg** – *Bitis gabonica*

**CTGF** – connective tissue growth factor

**Da** – *Dendroaspis angusticeps*

**DBS** – dried blood spot

**DN** – double negative

**EMT** – epithel mesenchymal transition

**EpCAM** – epithelial cell adhesion molecule

**FPLD** – familiar partial lipodistrophy

**Fz** – frizzled

**GSK** – glycogen synthase kinase

**ICAT** – intracellular inhibitor of catenin

**LAP** – lamina associated polypeptide

**LRP** – low density lipoprotein receptor-related protein

**MDI** – methylxanthine – dexametasone – iodine

**MVB** – multivesicular body

**PKC** – protein kinase C

**PPAR** – peroxisome proliferator-activated receptor

**TREC** – T-cell recombination excision circles

**Wnt** – wingless / integrated

kvell.krisztian\_95\_23



## BEVEZETÉS

A csecsemőmirigy vagy más néven tímusz primer immunológiai szövet, mely az érett naiv T-sejtek fejlődésének helyszíne. A folyamatos friss naiv T-sejt utánpótlás elengedhetetlen számos, az immunrendszerrel kapcsolatos folyamat egészséges működéséhez. Mivel a tímusz az immunrendszer egy korai és progresszív öregedést mutató primer szövete, jól tetten érhető a hiányos működésére visszavezethető immunpatológiák, úgy mint a fokozott hajlam súlyos, akár halált okozó vírusos megbetegedésekre (pl. influenza, COVID19 betegség, nyugat-nílusi láz stb.), magas halálozási rátával bíró szolid tumorok megjelenésére (pl. tüdő-, bél-, emlő-, prosztatadaganat stb.) illetve szisztémás és szervspecifikus krónikus autoimmun betegségek kialakulására (pl. lupus, Sjögren, Hashimoto stb.). Ahogy a tímusz működésének megértése, szerepe a betegségek kialakulásában egyre jobban kitárult, a funkciójával összefüggésbe hozható folyamatok a modern gyógyszerek fejlesztésének célpontjává váltak. A tímusz alapállományát képező epitél hálózat biztosítja a fejlődő timociták számára szükséges speciális közeget (niche), sejtfelszíni molekulák, szolubilis faktorok és extracelluláris vezikulák által nyújtott molekuláris jelek révén, melyek a timociták fejlődéséhez, éréséhez, differenciálódásához szükségesek, hogy friss naiv, funkcióképes T-sejtekként hagyják el a tímuszt.

Kutatásaim során a tímusz teljes életciklusát vizsgáltam egér modellben és emberi mintákban egyaránt, az embrionális fejlődéstől a fiatal felnőtt és középkoron keresztül az idős korban is. Kulcsfontosságú molekuláris eseményeket azonosítottunk a fejlődésben, illetve a tímusz esetében az öregedést képviselő zsíros degenerációban, involúcióban. Ezek nagyon fontos célpontok a folyamat sebességének befolyásolásában, ugyanis a tímusz öregedésének menete számos módon befolyásolható. Üteme lehet gyorsabb, de akár lassítható is. Jelentős előrelépést értünk el gyógyszerészi biotechnológiai módszerek alkalmazásával, mivel az azonosított célpontokra ható molekulák formulálásával, szelektív célba juttatásával (természetes exoszómák vagy mesterséges lipid nanopartikulák alkalmazása révén) kísérletes szinten lehetővé vált a tímusz progéria (gyorsult öregedés) lassítása és a tímusz regenerációjának növelése, ami hosszú távon csökkentheti a fertőző, daganatos és autoimmun betegségek kialakulásának kockázatát.

A fentiek ismerete és gyógyszerészeti alkalmazása pozitív hatást gyakorolhat a szociökönómiai trendekre, csökkentve az egészségügyi ellátórendszer terheltségét, egyszersmind növelve az egyén szintjén az öngondoskodást és az életminőséget. Lehetőséget ad az élettartam növekedésével párhuzamosan az egészségtartam, vagyis az aktív életkor kitolására, az élettartam és az egészségtartam összehangolására.

kvell.krisztian\_95\_23

## IRODALMI ÁTTEKINTÉS

### A TÍMUSZ ÖREGEDÉSE ÉS ZSÍROS INVOLÚCIÓJA EMBERBEN

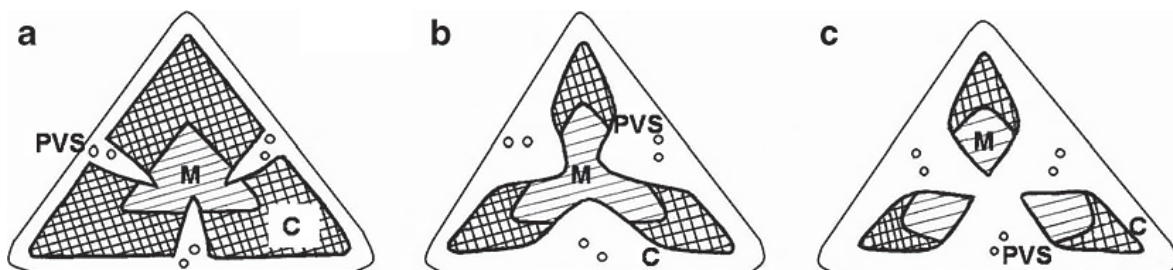
Az öregedés folyamatosan és fokozatosan zajlik, mely erodálja az egyes szövetek és szervek morfológiáját és funkcióját. (1) Az immunrendszer esetében ezt az immuno-szenescencia gyűjtőfogalommal írjuk le. (2) Ennek egyre nagyobb jelentősége van nem csak tudományos, hanem egyéni és társadalmi szempontból is, mivel a magas várható átlagéletkor révén fokozódó terhet jelent az ellátó rendszerek számára. Az immunrendszer öregedését gyengébb immunválasz kíséri, illetve csökken az új stimulusokra nyújtott válaszkészség is. (3, 4) Modern definíció szerint az immunrendszer öregedése az érintett szervek és szövetek korral járó változásaira adott átszerveződéssel járó folyamat. Ezek a változások mind a veleszületett, mind a szerzett immunrendszer elemeit érintik, s főként kifejezetten idős korban figyelhetők meg. (5) Az immunrendszer öregedése is felelős a fertőző, daganatos és autoimmun betegségek fokozott előfordulásáért idős korban. (6) Az immunrendszer öregedésének nem minden részlete ismert, de a tímusz involúció a folyamat egy központi eleme. A tímusz primer immunológiai szövet, feladata a nagy receptor repertoárral rendelkező immunkompetens friss naiv T-sejtek termelése. Nélkülözhetetlen szerepét először 1961-ben írták le, hiánya újszülött egerekben csökkent immunválaszt és visszatérő fertőzéseket okoz. (7) A kor előrehaladtával gyors hanyatlásnak indul a tímusz alapállománya. (8) A tímusz sorvadásának következtében nem csak fokozatosan csökken a friss naiv T-sejt termelő képessége, hanem megváltozik a perifériás T-sejtek összetétele, fenotípusa és funkciója is. (9) Ezek a változások együtt alakítják ki az immunosenescencia komplex fenotípusát. (10) A tímusz sorvadása, zsíros involúciója számos egyéb faj mellett emberben is megfigyelhető, vagyis egy evolúciósan ősi, konzervált mechanizmus lehet. (11)

A tímusz involúció a tímusz lebenyek perifériáján kezdődik, a zsírszövet felszaporodásával. Az erek menti területeken észlelhető először a degeneráció, melyet a zsírsejtek, limfoid sejtek és fagocitált vörösvértestek felhalmozódása jellemez. Ezt követi a csökkent a friss naiv T-sejt termelés. Egyidejűleg csökken a velőcső eredetű sejtek száma is, mely az érhálózatot hivatott támogatni. (12) A tímusz involúció nagyban függ a szexuál-szteroidoktól: mind az androgén, mind az ösztrogén gyorsítja a folyamatot. (13) Ezek fordítottja is ismert: a szexuál-szteroidok hatásának megszüntetése kémiai vagy sebészi kasztráció révén visszafordítja az öregedéssel kapcsolatos tímusz involúciót, és visszaállítja a tímusz funkcióját, csökkentve a timociták apoptózisát és növelve a T-sejtek és a tímusz epitél sejtek proliferációját. A tímusz epitél sejtek rendelkeznek szexuál-szteroid receptorokkal, mely szerepet játszik mind a tímusz fejlődésében, mind annak öregedésében (14, 15) Annak ellenére, hogy egyértelmű szerepe van a szexuál-szteroidoknak a tímusz involúcióban, mégsem ezek a tímusz öregedésének elsődleges okozói. Valójában nem csak az időskori tímusz involúciót képes visszafordítani a szexuál-szteroidok ablációja, hanem fiatal korban is képes fokozni a tímusz funkciót, mely a szexuál-szteroidok általános gátló hatását valószínűsíti. (16) Nem is követi a szexuál-szteroidok szintjét a tímusz involúció, hiszen a nemi hormonok szintje a pubertást során magas, majd azt követően a korral csökken, viszont a tímusz öregedése progresszívan folytatódik (17) Valójában a tímusz

öregedés már jóval a pubertás előtt megkezdődik. (18) Az is ismert, hogy a szexuál-szteroidok ab-lációjának köszönhető tímusz funkció javulás csak átmeneti, s ha fiatal korban történik, nem akadályozza meg a későbbi tímusz öregedést. (19, 20)

A tímusz hanyatlása pubertást követően kifejezettebb férfiakban, mint nőkben, melynek oka az eltérő szexuál-szteroid szintekben keresendő. (21) Az erek mentén figyelhető meg elsőként a tímusz állományának jelentős csökkenése 20-25 éves korban, s ezzel párhuzamosan ugyanezen területen tapasztalható jelentős zsírszöveti szaporulat megjelenése. (22) A tímusz fejlődése és életsiklusa során a morfológiai jegyek és biológiai markerek együttes követése lehetővé teszi a folyamat mélyebb megértését. A tímusz epitél sejtek jelentős mennyiségben termelnek IL-2, IL-9, IL-10, IL-13 és IL-14 citokineket, azonban ezek szintje jelentősen csökken az életkorral. Érdekes módon az IL7, IL-15 és G-CSF szintjei, bár nem olyan magasak, azonban a korrallal nem változnak. Ezzel ellentétben emelkedik a LIF, az M-CSF és a oncostatin-M szintje, melyek forrása a növekvő mértékben jelenlevő zsírsejtek csoportja. (23) A CXCL12 a CXC kemokin család tagja és a limfoid előalakok esetében az osztódás és túlélés szempontjából fontos folyamatokban vesz részt. Az IL-7 a CXCL12-höz hasonló hatást képvisel, biztosítva a CXCR4 expresszió indukálását a CD34+ limfoid előalakokon. Ezzel párhuzamosan az IL7 stimulálja a tímusz epitél sejtek CXCL12 termelését, majd a CXCL12 gátolja a tímusz epitél sejtek általi IL-7 termelést. Ezen túlmenően a dendritikus sejtek CXCR4-et és CXCL12-t is termelnek. Emberben nincs jelentős különbség a CXCL12 és CXCR4 tekintetében a fiatal és az idős kor összevetésében. Azonban jelentősen csökken a CXCR4 szintje a CD34+ limfoid előalakokban. (24) Csökken továbbá a korrallal az IL-7 szintje is. (25)

Gerincesekben az egyéb szöveteknél és szerveknél korábban zajlik le a tímusz öregedése. A tímusz öregedést a tímusz mikrokörnyezetének jelentős és drámai, strukturális és funkcionális átalakulása következtében a timociták számának drasztikus csökkenése kíséri. Ellentétben a fiatal tímusszal, ahol timociták alkotják a tímusz állományának jelentős részét, idős korban főként zsírsejtek töltik ki a sejtes állományt. (26, 27) Az időskori involúció jellemzője a tímusz méretének csökkenése, s azon belül a limfoid szöveteket felváltó zsírsejtes szaporulat. Ezért a kutatások többsége az immunológiai következményeket vizsgálja, s kevésbé fókuszál a zsírszövetre. Emberben 50 éves korra a tímusz funkcionális állományának jelentős része (kb. 80%) zsírszövetté alakul át (**1. ábra**). Az időskori változások miatt csökken a T-sejtes immunválasz, és következményesen emelkedik a fertőző, daganatos és egyes autoimmun betegségek gyakorisága, csökken a vakcinák hatékonysága és a T-sejtes rekonstitúció csontvelő-átültetés esetében. (28, 29) Vizsgálatok szerint a timociták és a zsírsejtek

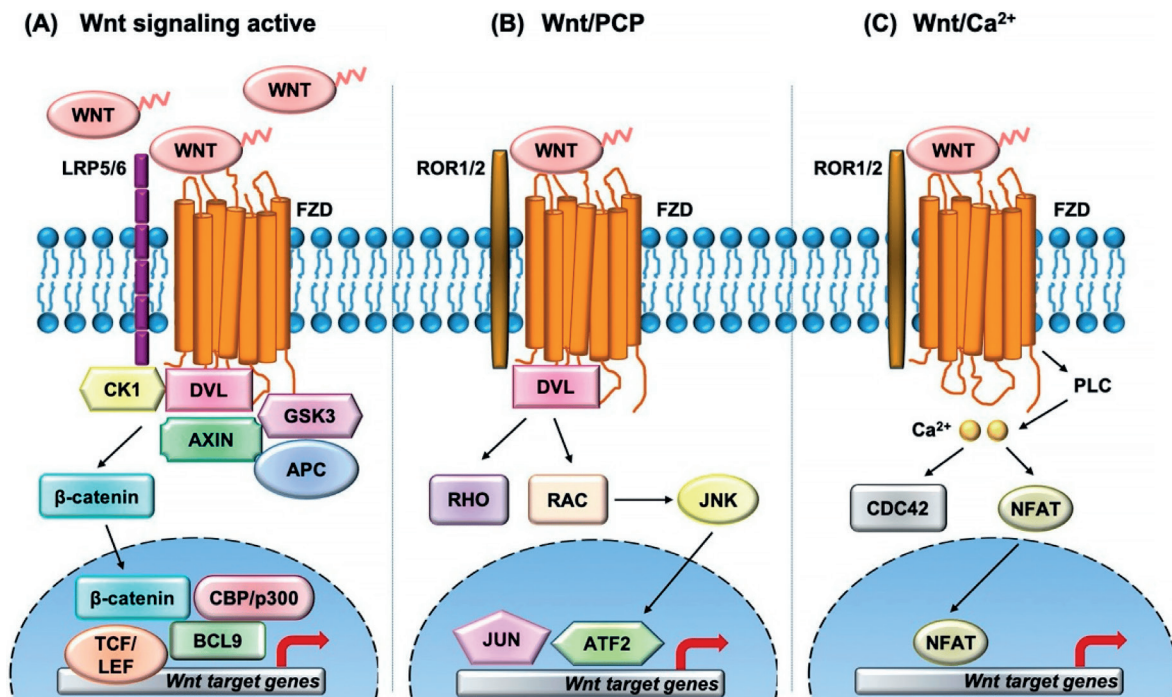


**1. ábra:** Sematikus ábra a tímusz zsíros involúciójáról. Gyerekkor (1 éves kor, **a**), fiatal felnőttkor (25 éves kor, **b**) és idős felnőttkor (78 éves kor, **c**). C: cortex, M: medulla, PVS: erek menti területek. Irodalmi forrás: Rezzani R et al, Age (Dordr). 2014

közvetlen sejt-sejt kapcsolatot létesíthetnek a tímusz öregedése során. (12) Nyilvánvalóvá vált, hogy a zsírszövetek nem passzív résztvevői a folyamatnak, hiszen citokin termelésük révén befolyásolják a helyi, sőt közvetve akár a szisztémás immunológiai funkciókat is. (30) Számos vizsgálat felvetette, hogy a zsírszövetek aktív és specifikus mechanizmusok révén szaporodnak fel helyileg, fokozatosan erodálva a tímusz funkcióját. (2, 27) Megfigyelések szerint a tímusz szírszövege számos angiogén faktort termel, úgy mint angiopoetin, VEGF és annak receptorai (R1 és R2), melyek együtt kihatnak a tímusz funkciójára és a zsírszövet további felszaporodását eredményezik. (31)

## A WNT JELÁTVITEL SZEREPE ÉS JELENTŐSÉGE A TÍMUSZBAN

A Wnt fehérjecsald 18 szekretált tagból áll, melyek a sejtek sorsát, polaritását és növekedését egyaránt befolyásolják a célsejtekben. (32) A Wnt gének esetében számos olyan mutáció ismert egérben, mely fejlődési rendellenességhez vezetnek. (33) A hibásan szabályozott Wnt jelátvitel gyakran daganatok kialakulásához is vezet, úgy mint a vastagbél, vese, máj prosztata vagy a petefészkek esetében. (34) A Wnt jelátvitel aktiválása során a Wnt glikolipoproteinek egy hét transzmembrán régióból álló Fz receptorhoz kötődnek a célsejt felszínén. Az Fz receptorok aktivitásához feltétlenül szükséges az LRP5 vagy LRP6 jelenléte. A sejten belüli jelátvitel elengedhetetlen feltétele a Wnt ligand kötődése a Fz / LRP receptor / koreceptor együtteshez. (35) A Wnt kaszkád a GSK-3b konstitutív aktivitásának gátlását eredményezi. (36, 37) Ennek eredményeként a beta-catenin nem foszforilálódik, így felgyülemlik a citoplazmában és a magban, ahol komplexet képez a TCF transzkripció faktorral, hogy aktiválja a Wnt célgéneket. (38-41) A magban beta-catenin hiányában a TCF a TLE család egyéb tagjaival asszociálódhat, mely a transzkripció általános gátlását okozza. Ezen a nem kanonikus útvonalon kívül egyéb Wnt jelátviteli útvonalak is ismertek, úgy mint a PCP vagy a Ca-mediált útvonalak. A ROR1 és ROR2 szintén rendelkeznek koreceptor aktivitással a kanonikus Wnt jelátvitelben. Az intracelluláris Dvl fehérje a Wnt-Fzd-ROR komplexumhoz kapcsolódva gátolja a GSK-3b aktivitását, ezen keresztül pedig a beta-catenin foszforilációját és lebomlását. A ROR fehérjék szintén képesek aktiválni PCP útvonalat, azon belül a ki GTPáz enzimeket, mint a RhoA és Rac1. (2. ábra). (42) A szekretált Wnt ligandok nélkülözhetetlenek a tímuszban zajló T-sejtek fejlődési folyamataihoz. A Wnt ligandok jelenléte a pro T-sejt és a pre T-sejt fejlődési állapotok eléréséhez egyaránt szükségesek. (43) Hiányukban csökken a tímusz sejt állománya, csökken a timociták proliferációja DN állapotban. (44) A Tcf-1 interakciója a beta-cateninnel szintén elengedhetetlen a timociták fejlődéséhez. (43) Kutatások szerint a Bcl-XL egy olyan Wnt célgén, mely a timociták apoptózisának gátlása révén járul hozzá a timociták fejlődéséhez, túlélést biztosítva számukra a tímuszban. (45) Irodalmi adatok többsége a timociták proliferációjával kapcsolatban említi a Wnt jelátvitelt, de egyes eredmények a timociták differenciációjával is összefüggésbe hozzák a korai DN fázisban, még a pre-TcR jelátvitel aktivitása előtt vagy azzal párhuzamosan, a TcR szelekciót megelőzően. (46) Kutatási eredmények arra utalnak, hogy a CD3 jelátvitel is hatással van ugyanezen folyamatra. (46) Természetesen a Wnt ligandok és Fz receptorok, illetve LRP 5/6 koreceptorok expressziója nem korlátozódik a timocitákra, a tímusz epitél sejtei szintén rendelkeznek az aktív Wnt jelátvitel minden elemével. A FoxN1,



2. ábra: Sematikus ábra a Wnt jelátvitelről. Kanonikus (A), PCP (B) és Ca<sup>2+</sup>-mediált (C) jelátviteli folyamatok és elemeik.  
 Irodalmi forrás: Sharma M et al, IJMS, 2020

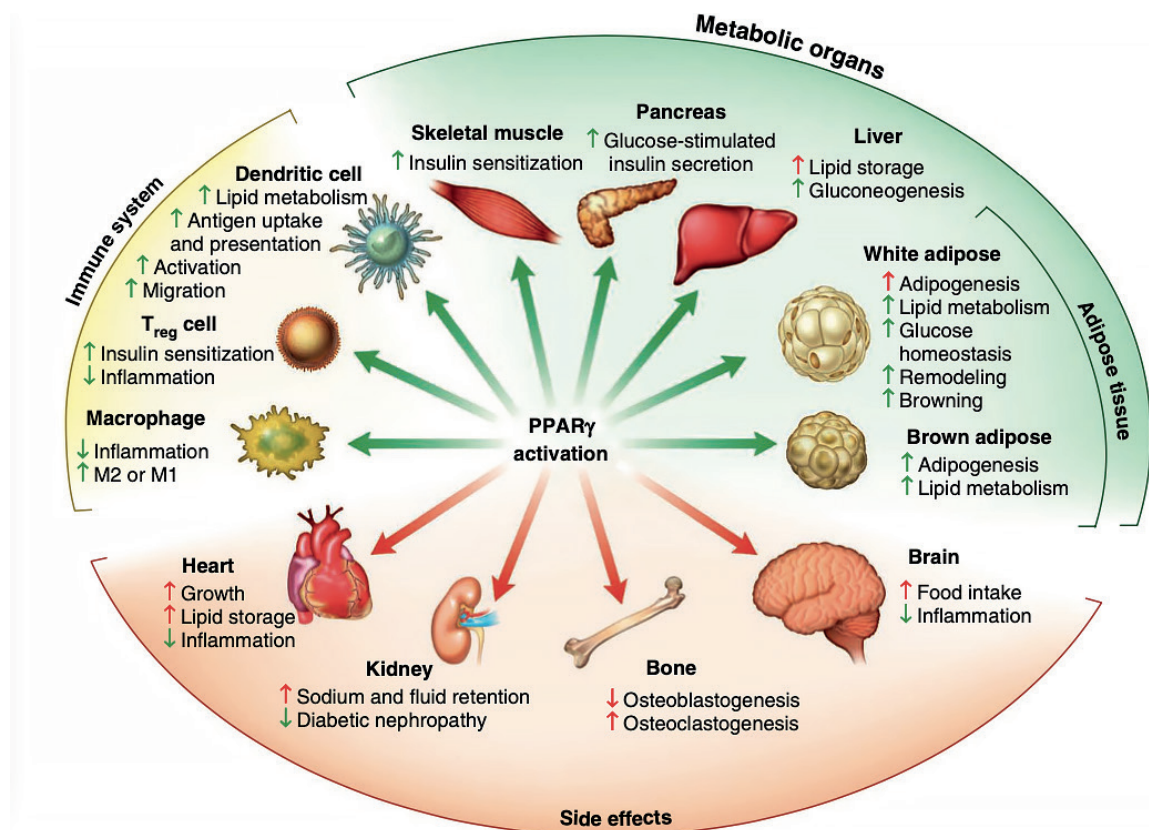
mely a tímusz epitél sejtek identitását alapvetően meghatározó transzkripciós faktor, esetünkben egy kiemelten fontos Wnt célgén, konkrétan a Wnt4 glikolipoprotein célgénje. (47) A FoxN1 gátlásával teljes tímusz aplázia érhető el az epitél sejt kompartment hiánya következtében, mely jellegzetes csupasz (nude) fenotípust is okoz, mivel a FoxN1 transzkripciós faktor a szőrtüszők fejlődéséhez is szükséges. (47)

## A PPAR MOLEKULACSALÁD ÉS JELENTŐSÉGE A TÍMUSZBAN

A magreceptorok családja az egyik legnagyobb az evolúciósan konzervált transzkripciós faktorok között. (48-50) A olyan magreceptorok ligandfüggő transzkripciós faktorok, melyek kis lipofil molekulákat kötnek, majd megváltoztatják konformációjukat. A kis lipofil molekulák származhatnak a sejtek aktivitásából, a mikrokörnyezetből és akár hormonokhoz hasonlóan is működhetnek. Kötődést követően a receptor konformációja és így funkciója is megváltozik, kihatva a génexpresszióra. A ligandfüggő transzkripciós faktorok kiváló célpontok terápiás célra fejlesztett hatóanyagok számára. A PPAR család a thy-ret magreceptor család egyik tagja. 1990-ben történő felfedezésük után számos fajban sikerült kimutatni őket: halban, kétélűben, egérben és emberben is. (51-58) Megkülönböztethető PPAR alpha, beta/delta és gamma variáns, melyek eltérő kromoszómákon kódolódnak és eltérő szöveti megoszlást mutatnak. Bár nem klasszikus izoformák, mégis mutatnak egymással homológiát. Ezen kívül mindhárom PPAR rendelkezik további splice variánsokkal és izoformákkal. A PPARgamma esetében legalább három promoter ismert. (58, 59) Az 1-es és a 2-es promoter ugyanazt a fehérjét eredményezik (PPARgamma1), kiegészítve 5' UTR nukleotiddal az mRNS-t. A 2-es pro-

moter esetében az N-terminus további 30 aminosavval bővül ki, ezt PPARgamma2 névvel illetjük. A PPARgamma1 szöveti jelenléte általános és alacsony szintű, a PPARgamma2 jellemzően csak a zsírszövetekben expresszálódik, azonban magas szinten. A 3-as promoter aktivitása a bél, zsírszövet és makrofágok sejtekre egyaránt jellemző. (60)

A PPARgamma közismert zsírszöveti funkciója ellenére először emberi csontvelőből került klónozásra és így számos immunológiai kutatás fókuszába került. (57, 61, 62) A PPARgamma expresszió jellemző még zsírszöveteken kívül a lépben, a vastagbélben, a húgyhólyagban, monocitákban, endotél sejtekben, simaizom- és vázizom sejtekben (3. ábra). Transzkripciós faktorként már nagyon alacsony szintű expresszió mellett is funkcionál, és egyre több szövetben sikerül kimutatni. A PPARgamma egyik érdekes tulajdonsága a fokozottan érzékeny indukálhatósága. *In vitro* tenyésztés során már minimális eltérések is képesek az expressziót kiváltani. (63) A PPARgamma expresszióját kutatások szerint befolyásolja a TNFalpha, az inzulin, a 9-cis retinsav, az oxidált LDL, GM-CSF és M-CSF, valamint az IL-4 (60, 64) A PPARgamma immunrendszeri hatása főként annak tudható be, hogy antagonizálja a TNFalpha által közvetített gyulladást. (65) A monociták fejlődésében és funkciójában szintén ismert szerepe. A prosztaglandinok közül a PGD2 útvonal képviselője, a 15-d-J2 prosztaglandinhoz kötődik mely aktiválja a PPARgamma-t. A PGD2 fokozottan jelen van a cerebro-spinális folyadékban, monocitákban, megakariocitákban és hízósejtekben. A tímusz esetében a limfociták közül a medulla állományban levő érettebb T-sejt előalakok, míg az alapállományon belül a cortex és a medulla epitél sejtjei expresszálják PPARgamma transzkripciós faktort felnőttben. (63)

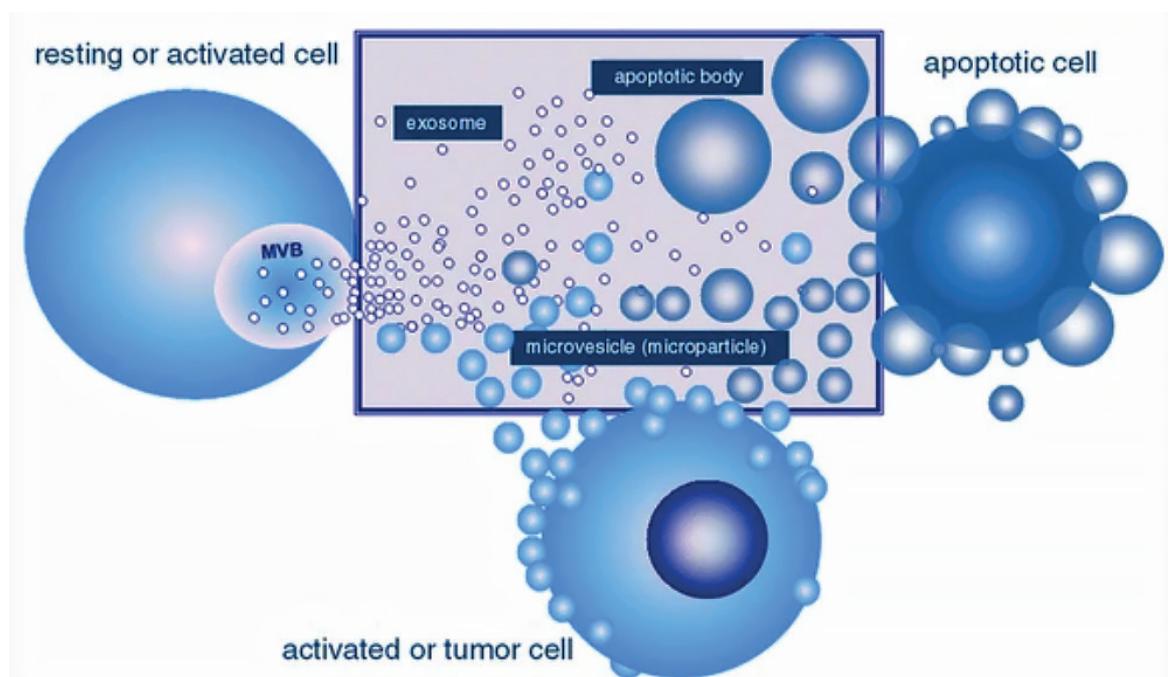


3. ábra: A PPARgamma által befolyásolt szövetek. A kiterjedt metabolikus hatás mellett az immunrendszerre is hat a PPARgamma. Irodalmi forrás: Ahmadian M et al, Nat Med, 2013

## EXOSZÓMÁK ÉS JELENTŐSÉGÜK A TÍMUSZBAN

Az exoszómák olyan kis méretű extracelluláris vezikulák (30-100nm), melyeket a sejtek a sejtközi térbe bocsátanak ki. Az exoszómák keletkezésük során először a késői endoszómába bimbóznak be-felé, létrehozva az MVB sejtalkotót, majd csoportosan ürülnek a sejtek közötti térbe (**4. ábra**). (66, 67) Irodalmi visszatekintésben az érett vörösvértesteket elhagyó transferrin receptor endocitózis révén történő levedlése volt az exoszómák első tudományos leírása. (68) Egy különösen nagy hatá-sú felfedezés az exoszómák miRNS tartalmának első leírása volt. (69) Az exoszómális miRNS-ek génextpressziós szabályozó funkcióval rendelkeznek. (70, 71) Az exoszómák gyakoriak és nagy számban tisztíthatók számos testnedvből, mint pl. vér, vizelet, nyál vagy akár tüdő lavage-folyadék. (72-76) Kiemelkedő kutatási területük a különböző betegségeket megelőző diagnosztikus biomar-kerként történő alkalmazásuk. (77) Az exoszómák terápiás eszközök is lehetnek, pl. daganatellenes kezelésben az immunrendszer sejtjei által vagy éppen a daganatsejtek által termelt exoszómák fel-használásával. (78-80) Ételkomponensekkel szembeni tolerancia-keltésre is alkalmazhatók pl. a bél epitél sejtek vagy B-sejtek által termelt exoszómák. (81-83)

A tímuszban is ismert az exoszómák jelenléte. (84) Nagy mennyiségben tartalmaznak TGF-beta, CD9 és MHCII molekulákat. Emberi tímusz explant kultúrákból ismert jelenlétük és összetételük. (85) A tímuszban található exoszómák szintén 30-100nm méretűek, sűrűségük 1,18-1,19 g/ml és nagy mennyiségben tartalmaznak TSG101, CD9, CD81, illetve HLA-DR molekulákat. (86) Ha az exoszómák teljes tímusz szövetből kerülnek izolálásra, sejtforrásuk vegyes, származhatnak timoci-tákból, dendritikus sejtekből és epitél sejtekből egyaránt, bár utóbbi a legjelentősebb forrásuk. A tímusz nagy mennyiségben termel exoszómákat más szövetekhez képest, alacsony CD63 és magas TSG101 expresszió mellett. Jellemzően fokozott mennyiségben tartalmaznak kis számú, nem tí-



**4. ábra:** Extracelluláris vezikulák. Méret és biogenezis alapján megkülönböztetünk exoszómákat, mikrovezikulákat és apoptotikus testeket. *Irodalmi forrás: György B et al, CMLS, 2011*



musz-specifikus fehérjéket, mint pl. ciklikus-nukleotid foszfodiészteráz, reticulon 3, tropomyosin 3 és GNAS. Ezek a fehérjék vélhetően a timociták szelekcióját segítik, mivel mind autoimmun betegségek célpontjai. (87-90) További potenciális autoantigéneket is tartalmaznak, így hozzájárulva a timociták szelekciójához és megelőzve autoimmun betegségek kialakulását. Ilyen autoantigének a myelin bázikus fehérje, a II-es típusú kollagén, a TITIN, a HSP60, a transzglutamináz 2 vagy a desmoglein 1 és 3. (91-95) További szöveti antigének jelenlétét is kimutatták a tímusz medulla által termelt exoszómákban, úgy mint glutation GSTM3, LDL receptor, SLC16A3, mucinok és myozin 1B. Meglepő módon a tímusz epitél eredetű exoszómák még a tímusz epitél sejtek citoplazmájánál is nagyobb arányban tartalmaznak ilyen fehérjéket, mely aktív transzport folyamatra utal. Mivel az exoszómák MHC molekulákat is szállítanak, vélhetően lokális antigén-bemutatóra is alkalmasak. A tímusz epitél sejtek *in vitro* is nagy mennyiségben termelnek exoszómákat, mely fontos tényező exoszóma termelési szempontból (részleteiben későbbi fejezetben kerül tárgyalásra).

kvell.krisztian\_95\_23

# CÉLKITŰZÉSEK

## ELMÉLETI CÉLKITŰZÉSEK

- A tímusz embrionális organogenezisében domináns molekuláris folyamatok azonosítása, összevetése egérben és emberben, az egér modell létjogosultságának igazolása molekuláris szinten
- A tímusz öregedésében, zsíros involúciójában domináns molekuláris folyamatok azonosítása, összevetése egérben és emberben, egér modell létjogosultságának igazolása molekuláris szinten
- A tímusz öregedésében, zsíros involúciójában megjelenő zsírsejtek forrásának azonosítása, a zsírszövet jellemzése (ultra-strukturális, molekuláris, sejtes, szöveti és anyagcsere)
- A tímusz öregedésének sebességét befolyásoló (progerogén és regenerogén) endogén (pl. genetikai háttér, hormonok) és exogén (pl. kémiai anyagok, életmód) tényezők azonosítása
- A tímusz öregedésének sebességét befolyásoló (progerogén és regenerogén) hatás tartós jelenléte esetén a tímusz funkcionális állapotváltozásának kimutatása egérben és emberben

## MÓDSZERTANI CÉLKITŰZÉSEK

- A tímusz funkcionális állapotát mérő módszer (TREC-mérés) adaptálása digitális PCR platformra, a mintavétel optimalizálása szűrőpapírra cseppentett ujjbegy vér használatára (DBS)
- A tímusz öregedését, zsíros involúcióját modellező *in vitro* rendszer kidolgozása egér és emberi tímusz epitél sejtek használatával, nagy áteresztőképességű (HTS) szűrőrendszer létrehozása
- A végpontok, vagyis pozitív és negatív kontrollok, esetünkben progerogén és regenerogén hatóanyagok azonosítása és alkalmazása *in vitro* modell rendszerben
- Progerogén és regenerogén termék tesztelése *in vivo* kísérleti állatmodellben (egérben), optimális beviteli platform azonosítása, lehetséges termelési lehetőségek tesztelése pilot léptékben

kvell.krisztian\_95\_23

## ANYAG ÉS MÓDSZER

### LENTIVIRÁLIS VEKTOROK TERMELÉSE

Késői második generációs lentivirális vektorokat készítettünk az irodalom szerint. (96) Röviden egy envelope konstrukció (pMD.G), egy packaging konstrukció (R8.91) és egy transzfer konstrukció (pWPTS) kerültek együttesen ko-transzfekcióna 293T sejteket használva 1 µm klorokin jelenlétében kalcium-foszfát módszert alkalmazva. Overnight inkubációt és tápoldat-cserét követően a vírustermelő sejtek felülűszóját 24h elteltével összegyűjtöttük, centrifugáltuk (2000rpm, 10min, 4°C) és átszűrtük (0,45 µm PVDF filter) a sejtörmelék eltávolítása érdekében. A felülűszókat szélesztottuk, majd -80°C-on tároltuk felhasználásig.

### SEJTVONALAK TRANSZFEKCIÓJA LENTIVIRÁLIS VEKTOROKKAL

A célsejteket spinokulációval transzfektáltuk az irodalom szerint. (97) Röviden, a vírustartalmú felülűszókat kiolvasztottuk és 24-well plate-ben centrifugáltuk (3600 rpm, 60 min, 4°C). Ezután a felülűszót leszívtuk és óvatosan 20.000 sejtet rétegeztünk rá 2 ml tápoldatban. A sejteket először 3 nap elteltével teszteltük. A biológiai titert (TU/mL) erősen permisszív Jurkat sejteken állapítottuk meg ugyanígy. Célsejttől függően eltérő vírushennyiségeket használtunk 1-10 MOI között.

### SEJTVONALAK

Az egér sejtvonalakat (TEP1) DMEM, míg az emberi sejtvonalakat (1889c, A549, PC9, 293T, Jurkat) RPMI tápoldatban tenyésztettük kiegészítők hozzáadása mellett (10% FCS, penicillin / streptomycin és egér sejtek esetében beta-merkaptó-etanol) az irodalom szerint. (98, 99). Az exoszóma-termelésre használt sejteket exoszóma-mentes körülmények között tenyésztettük. A tenyésztést minden esetben sejtinkubátorban végeztük 37°C, 5% CO<sub>2</sub>, telített páratartalom mellett.

### KÍSÉRLETI EGEREK

Kísérlettől függően vad típusú és PPARgamma heterozigóta (haplo-insufficiens) vagy null (KO) egeret használtunk C57BL/6J genetikai háttéren. A kísérletben használt egerek csoportjai korban és

nemben megegyeztek egymással. A PPARgamma KO genotípus létrehozása röviden az alábbiak szerint történt. A PPARgamma<sup>+/-</sup>/Sox2Cre<sup>+</sup> hím egereket PPARgamma<sup>fl/fl</sup> nőtény egerekkel kereszteztük, hogy heterozigóta PPARgamma<sup>fl/-</sup>/Sox2Cre<sup>-</sup> és homozigóta PPAR gamma<sup>Δfl/-</sup>/ Sox2Cre<sup>+</sup> egereket kapjunk, ahol a floxolt allél rekombinálódott, null (KO) allélt eredményezve. Más kísérletekhez időzített terhes BALB/c genetikai háttérű egerek E12-korú embrióiból származó tímusz lebenyeket használtunk. Használtunk továbbá 4 hetes, 1 éves és 1,5 éves GFP-transzgenikus BALB/c genetikai háttérű egereket is. Az állatokat állatházainkban tenyésztettük (kivéve PPARgamma egerek tenyésztését, melyek helyszíne a Debreceni Egyetem volt). Az egerek tenyésztése és kísérletei során tekintettel voltunk a vonatkozó hazai és nemzetközi szabályozásokra. Idős állatok esetén a természetes öregedés volt a 'kezelés', egyéb külső behatás nélkül. Az egerek tenyésztése 'minimal disease' körülmények között történt. Az állatházban 15 alkalom/óra rendszerességű volt a légcserre, autoklávozott pellet tápot ettek (Altromin VRF1) illetve csapvizet ittak *ad libitum*. A ketrecek rendszeresen almoztuk, környezetgazdagításnak papírgurigát használtunk. A helység megvilágítása automatizált volt 12 órás világos / sötét ciklus váltogatásával. A helység hőmérséklete 21 ± 2°C volt, a relatív páratartalom 30-60% között. Az etikai engedélyek száma: BA02/2000-46/2016 (Pécs) és TMF/82- 10/2015, illetve TMF/124-11/2017 (Debrecen).

## KÍSÉRLETI EGEREK CUPRIZON KEZELÉSE

Felnőtt hím C57BL/6 egereknek négy hetes kortól kezdve *ad libitum* adagolva 3-7 napon keresztül a táp 0,2% cuprizont tartalmazott (bis-cy- clohexanon- oxaldihidrazon) (Sigma, Steinheim). A kontroll csoport korban és nemben megegyezett, de nem kapott cuprizont.

## BETEG EREDETŰ TÍMUSZ MINTÁK

Kollaborációnk emberi tímusz minták kiértékelése során során 82 tímóma / tímusz karcinóma, illetve 21 normál tímusz mintát dolgozott fel. A vizsgálatot a helyi etikai bizottság hagyta jóvá (#2009-290N-MA/2010 és 2018-516N-MA, Mannheim, Németország).

## EGÉR ÉS EMBERI, TÍMUSZ SEJTEK ÉS TÍMUSZ MINTÁK SZÖVETTANI FESTÉSE

Az *ex vivo* kísérletekhez az E12 és E15 időzített terhes egerek embrióinak tímusz lebenyeit használtuk. Az emberi tímusz minta W15 abortált magzatból származik. Az abortuszt Patau-szindróma (13-as kromoszóma triszómia) diagnózisa indokolta (mely nem zavarja a tímusz embrionális fejlődé-

sét). A beavatkozások a releváns nemzeti és nemzetközi irányelvnek megfelelően lettek végrehajtva (engedélyszám: 8-2/2009-1018EKU) a regionális etikai bizottság jóváhagyása mellett. Az emberi tímusz lebenyeket paraformaldehidben (4% PFA PBS-ben) fixáltuk, majd paraffinba ágyasztuk. Az 5µm vastag metszeteket immunohisztokémiával festettük. Először a metszeteket xilolban öblítettük, majd alkohol csökkenő sorozatában mostuk le a paraffint. Deparaffinizálás után a metszeteket desztillált vízben hidratáltuk, majd az antigén-visszanyerést Target Retrieval oldatban (pH 6, DAKO) 97°C-on 20-30 percig melegítve végeztük el. Ezután a metszeteket vízben mostuk, és az endogén peroxidáz aktivitást 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó TBS-sel (pH 7,4) blokkoltuk 15 percig. Ezt követően a metszeteket háromszor mostuk TBS-ben, amely Tween-t (0,05%, pH 7,4) tartalmazott. A blokkolást 3% BSA-t tartalmazó TBS-ben 20 percig végeztük, majd az anti-PPARgamma (1:100, nyúl monoklonális antitest klón: C26H12, Cell Signalling Technology) elsődleges antitesttel történő overnight inkubációt 4°C-on végeztük. TBX-1 festés esetén anti-TBX-1 primer ellenanyagot alkalmaztunk (1:100, nyúl poliklonális antitest, Sigma-Aldrich). Az inkubáció után a metszeteket háromszor mostuk TBS-ben, majd 90 percig inkubáltuk peroxidázhoz kötött másodlagos antitesttel (1:100, poliklonális kecske anti-nyúl IgG, DAKO). A jelölést folyékony DAB szubsztrát-kromogén rendszerrel (DAKO) vizualizáltuk. Hematoxin szolgált magfestésként. A metszeteket Faramount Aqueous Mounting Mediummal fixáltuk (DAKO). Panoramic MIDI digitális dia-szkennerrel (3DHistech) történt a szövettani kiértékelés, és a képeket CaseViewerrel rögzítettük. A képanalízis ImageJ / IHC toolbox segítségével végeztük.

Fluoreszcens festés esetén eltérő protokollt követtünk. Egér és humán tímuszból 9µm vastagságú metszeteket készítettünk, amelyeket hideg acetonnal fixáltunk, 5% BSA-t tartalmazó PBS oldattal blokkoltunk 20 percig a festés előtt, majd anti-Ly51-PE (6C3 klón, BD Pharmingen), anti-EpCAM-FITC (G8.8 klón, laborunkban készített monoklonális antitest), anti-K8 (Ks8.7 klón, Santa Cruz Biotechnology), anti-Wn4 (C-14 klón, Santa Cruz Biotechnology) vagy anti-Fz4 (C-18 klón, Santa Cruz Biotechnology) ellenanyagokkal festettünk. A jelöletlen antitesteket Northern Light másodlagos antitestekkel vizualizáltuk (NL557 család, NL001: anti-kecske, NL007: anti-egér R&D Systems). A PKC izoformák szövettani analizéséhez az alábbi ellenanyagokat használtuk: elsődleges antitestként anti-PKCδ (658-676) pAb (Calbiochem) (1:100), anti-PKCδ (C-17) (Santa Cruz) (1:100), anti-Fz-4, anti-Fz-6 (R&D systems Inc.) (1:100) és FITC-jelzett anti-EpCAM1 (klón G8.8) (American Type Cell Culture Collection) (1:50), illetve anti-Ly51-PE (BD Pharmingen) (1:50) került alkalmazásra. A másodlagos antitestek NorthernLights számár anti-kecske IgG-NL493, számár anti-patkány IgG-NL557 és számár anti-nyúl IgG-NL663 voltak (R&D Systems Inc.). A metszeteket Olympus BX61 rendszeren értékeltük ki. A tenyésztett E12 egér tímusz szövetmintákat paraformaldehiddel fixáltuk, majd ugyanazokat a reagenseket használtuk, mint a fent leírt módon, azonban a fixálási, mosási és festési időket meghosszabbítottuk (~60 perc), hogy az antitestek bejussanak az embrionális tímusz lebenyekbe. Konfokális fluoreszcens képeket az Olympus Fluoview-1000 rendszeren rögzítettünk.

Lipid festés esetén szintén eltérő volt az alkalmazott protokoll. Citospin technikát alkalmazva TEPI és 1889c sejteket üveglapra centrifugáltunk. Az üveglapokat hideg acetonnal fixáltuk, majd szárították és 20 percig blokkoltuk őket 5% BSA-ban PBS-ben, mielőtt fluorokrommal vagy elsődleges antitesttel festettük volna, melyek az alábbiak voltak: anti-EpCAM-FITC (1:100, klón: G8.8, laborunkban készített monoklonális antitest), anti-UCP-1 (1:100, nyúl poliklonális antitest, Abcam),

anti-TBX-1 (1:100, nyúl poliklonális antitest, Sigma-Aldrich), anti-PPAR-gamma (1:100, nyúl monoklonális antitest, Cell Signaling Technology). Másodlagos antitestként Alexa-555 jelölt kecske anti-nyúl IgG-t (1:200, Life Technologies) használtak. A LipidTOX Red festéket (1:200, Invitrogen) fluoreszcens lipidek festésére alkalmaztuk paraformaldehid (4%) által fixált TEP1 és 1889c citoszin metszeteken. Kontraszt magfestést is alkalmaztunk (DAPI, Life Technologies). Az egyes mintákat Nikon Eclipse Ti-U mikroszkóppal vizsgáltuk CCD kamera (Andor Zyla 5.5) és NIS-Elements szoftver segítségével. Western-blot analízishez nyúl poliklonális anti-PKC $\delta$  (C-17), anti-Dvl(C-19) (Santa Cruz), anti-Fz-6 és anti-Fz-4 (R&D systems) antitesteket használtunk elsődleges antitestként, és HRP-konjugált anti-nyúl és anti-kecske (Santa Cruz) antitesteket használtunk másodlagos antitestként.

## EGÉR SEJTEK ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS VIZSGÁLATA

A timocita altípusokat és T-sejt alpopulációkat áramlási citometriával vizsgáltuk. A timociták és a PBMC izolálása után fluoreszcens festékekkel jelöltük őket 5% BSA PBS-ben. Minden esetben 100,000 sejtet jelöltünk meg. Az antitestekkel történő inkubáció 4°C-on 60 percig történt, ezt követte egy mosási lépés. Az elemzéshez a FACSCanto II áramlási citométert és a FACSDiva programot használtuk (Becton Dickinson). Minden esetben 10,000 eseményt rögzítettünk áramlási citometriával az R1 morfológiai limfocita kapun belüli. A timocita altípusok méréséhez az Alexa-647 anti-egér CD4 (klón: YTS 191) és a FITC anti-egér CD8 (klón: IBL 3/25) antitesteket használtuk. A perifériás vér T-sejtes alpopulációk elemzéséhez Pacific Blue anti-egér CD3 (klón: 17A2), PerCP anti-egér CD4 (klón: GK1.5), APC/Cy7 anti-egér CD8 (klón: YTS156.7.7), PE anti-egér CD44 (klón: IM7), APC anti-egér CD62L (klón: MEL-14) és FITC anti-egér CD19 antitesteket használtuk (BioLegend).

## ORÁLIS TOLERANCIA KELTÉSE EGÉRBEN

Mind a vad típusú, mind a PPAR-gamma haplo-inszufficiens egerek 5 mg/ml ovalbumint (OVA, Sigma-Aldrich) kaptak ivóvízben hét napig. A 7. és 14. napon az egereket intraperitoneálisan 5  $\mu$ g ovalbumin 1:1 arányú PBS és komplett Freund adjuváns oldatával oltottuk. A szérumot a 21. napon gyűjtöttük össze, majd az anti-OVA IgG antitestek szintjét ELISA segítségével mértük. Ehhez 96-well plate lemezeket (Sarstedt) OVA-val vontunk be majd BSA-val blokkoltuk. Ezután a lemezeket egér szérum mintákkal inkubáltuk hígítási sor (1:100-1:3,200) alkalmazásával. Az antitest tartalom a HRP-konjugált anti-egér immunglobulin antitest segítségével lett megjelenítve (nyúl poliklonális, Dako). Az optikai sűrűséget az iEMS Reader MF (Thermo Labsystems) segítségével mértük.



## INFLUENZA VAKCINÁLÁS EGÉRBEN

Mind a vad típusú, mind a PPAR $\gamma$  haplo-insufficiens egereknek egyszeri intramuszkuláris injekcióval 0,1 mL humán szezonális influenza oltóanyagot adtunk be (3Fluart), utánozva az emberi oltási protokollt. Szintén a humán expozíció mintázatát utánozva az egyszeri oltás után 3 hónappal, vagyis 12 hónapos (a tímusz szempontjából már idős) korban mértük ELISA-val a szérumban lévő IgG antitest titerét H1N1 A/California/7/2009 törzs ellen (mely a 3Fluart része). A detektáláshoz az ELISA lemezeket influenzavírus-törzs 0,05  $\mu$ g HA fehérjével telítettük (Rekombináns szubtypus H1N1 A/California/7/2009 His Tag, Life Technologies). Ezután az egér szérumból származó sorozatos hígításokkal inkubáltuk a lemezeket (1:5–1:1,600 hígításban). Az antitest tartalmat a HRP konjugált anti-egér immunglobulin antitest segítségével jelenítettük meg (nyúl poliklonális, Dako). Az optikai sűrűséget az iEMS Reader MF készülékkel 492 nm-en mértük (Thermo Labsystems).

## EX VIVO EGÉR TÍMUSZ LEBENY KÍSÉRLETEK

Az egér embrionális E12 és E15 tímusz lebenyeket DMEM tápoldatban tenyésztettük (az E12 egér tímusz lebenyek timocita progenitoroktól mentesek), amelyet 10% FCS-sel, penicillinnel, streptomycinnel és beta-merkaptó-etanolal egészítettünk ki (Lonza Walkersville). Az epitél sejteket specifikusan transzfektáló rekombináns adenovírus preparátumokat adtunk hozzá (az adenovírus vektorok angol kollaborációs partnertől származtak) az egér tímuszlebenyek tápoldatához, amelyeket tovább tenyésztettünk hét napon keresztül. Az E12 egér tímusz epitél sejtek áramlási-citometriás analízise a transzfekció után 48 órával történt. Az E15 egér timocitákat mechanikus diszperzióval nyertük ki (az epitélsejt-vázat ez megkíméli), majd 7 nappal transzfekció után megfestettük. Az egér timocitákat anti-CD4-PE (H129.19 klón, BD Pharmingen) és anti-CD8-FITC (53-6.7 klón, BioLegend) antitesztekkel festettük. FACS Calibur citométert és a Cell Quest szoftvert használtuk az analízishez (Becton Dickinson, USA). A kontroll és Wnt4-sejtekből származó transzgenikus TEP1 sejtek felülűzőit használtuk a tímusz lebenyek kezelésére 10 napon keresztül alkalmazva. (A tisztított rekombináns Wnt fehérjék inaktíválódnak extenzív tisztítási folyamat során, ezért volt felülűző frakció használatára szükség). A timociták által közvetített hatások kizárása érdekében vagy E12 egér tímusz lebenyeket használtunk (az E12 egér tímusz lebenyek timocita progenitoroktól mentesek), vagy az E15 egér tímusz lebenyeket előkezeltük deoxiguanozinnal 2mM koncentrációban 5 napon keresztül alkalmazva (Sigma), mely szelektíven a gyorsan osztódó timocitákat öli meg.

## KÍGYÓMÉRGEK

A liofilizált BG és DA kígyómérgek kereskedelmi forgalomból származtak (Latoxan S.A.S., Portesles-Valence, Franciaország). A liofilizált kígyómérget PBS pufferben oldva feloldva kaptuk törzsol-

datainkat 10 mg/mL koncentrációt alkalmazva. A törzsoldatból hígítási sort képeztünk, melyek koncentrációja 30, 100, 300 és 1.000 µg/mL volt.

## SEJTEK ÉS EGEREK SZTEROID KEZELÉSE

A TEP1 és 1889c sejtekben szteroid-kezelés révén modelleztük az öregedés folyamatát. Ehhez szteroid (dexametazon, DX) kezelést alkalmaztunk 1 µm végkoncentrációban 7 napon keresztül. A dexametazon (Sigma) törzsoldata 4 mg/mL koncentrációjú volt, DMSO-ban beoldva. Kontroll kezelésként azonos hígítású DMSO kezelést alkalmaztunk. Egér esetében négyhetes BALB/c egereket használtunk. Az állatok egyszeri adagban (20 mg/ttkg) kaptak dexametazon injekciót intraperitoneálisan (i.p.) PBS-ben, majd 24- illetve 168 órával az injekció után megvizsgáltuk őket. A kontroll állatok csak PBS-t kaptak. Egy másik egércsoport PBS-t vagy dexametazont kapott 3 hónapig. Volt olyan csoport, amely egyszeri magas dózisu dexametazont kapott, majd egy hónapig folyamatosan alacsony dózisu fenntartó kezelést (2 mg/ttkg) kapott minden második napon, utánozva az autoimmun betegek terápiás protokollját.

## EGÉR ZIGÓTA IZOLÁLÁSA, PERIVITELLIN INJEKCIÓ, IMPLANTÁCIÓ

Minden BALB/c és FVB/n egér (kontroll és transzgén egyaránt) hagyományos állatházban volt tenyésztve (MBK, Gödöllő). A transzgén egerek előállításához alacsony titerű lentivirális vektort használtunk a perivitellin térbe történő injektálás révén az irodalom szerint. (100) Mintegy 300-500 pl alacsony titerű ( $10^6$ - $10^8$  TU/mL) lentivirális vektort fecskendeztünk több adagban a perivitellin térbe, egysejtes zigótákba. A donor nőstények szuperovulációja, az embrió izoláció és átültetés standard laboratóriumi protokollok szerint történt. A besugarazott egerek a csontvelő-transzplantációt követő első 4 héten ciprofloxacint kaptak. A gödöllői MBK Állatjóléti és Etikai Bizottsága jóváhagyásával, illetve a magyar releváns törvényi szabályozásokkal összhangban történt az állatok tartása és a fent leírt beavatkozás.

## IN VIVO FLUORESZCENS KÉPALKOTÁS

Az eGFP és auto-fluoreszcencia kiértékelése kék fény segítségével történt (GFP excitáció: 455–495 nm, filter: 500 nm alatt). Újszülött és felnőtt egerek esetében egyaránt GFSP-5 headsetet alkalmaztunk (Biological Laboratory Instruments, Budapest).

## TRANSZGENIKUS SEJTEK, SZÖVETEK ÉS ÁLLATOK

A GFP-transzgenikus BALB/c modellt lentivirális transzgenézis útján hoztuk létre (lásd fent). A Wnt4 szekvenciát Origene vektorból szubklónoztuk, amely tartalmazta az emberi teljes hosszúságú Wnt4 cDNS-t. A teljes hosszúságú egér LAP2alpha cDNS-t tartalmazó plazmid Dr. Simon Amos kollaborátortól származik. A GFP, LAP2alpha és Wnt4 over-expresszálo TEP1 sejtvonalakat és E12 timusz lebenyeket lentivirális vektorok felhasználásával hoztuk létre. Overnight lentivirális transzfekeció után a timusz lebenyeket Nucleopore membránra (Whatman) helyeztük, majd DMEM tápoldatban tenyésztettük, amelyet 20% FCS, penicillin, streptomycin, ciprofloxacín, amphotericin-B és b-merkaptóetanol egészített ki (Lonza Walkersville).

## TRANSZMISSZIÓS ELEKTRONMIKROSKÓPIA

A sejteket 2,5% glutaraldehid tartalmú PBS-ben vettük fel, majd fixáltuk egy éjszakán át 4°C-on. Fixálást követően a sejt pelletet 3% zselatinnal (Sigma-Aldrich) elegyítettük. Körülbelül 1mm<sup>3</sup>-es blokkokat vágtunk ki a megkeményedett zselatinos masszából. A blokkokat 1% osmium-tetroxidot tartalmazó PBS-ben fixáltuk 1 órán át 4°C-on, majd fokozatosan növekvő etanol-koncentrációval dehidratáltuk. Kontraszt növelése érdekében 1% uranyl-acetátot (70% etanol oldatban) adtunk hozzá. Teljes dehidratálás után a blokkokat kétszer áttettük propilénoxidba 4 percre. Azután a blokkokat propilénoxid és Durcupan gyanta (Sigma-Aldrich) keverékébe helyeztük 30 percre. Később a blokkokat Durcupan-tartalmú alufóliába helyeztük éjszakára, majd Durcupan gyantába (Sigma-Aldrich) ágyasztuk. A gyanta 56°C-on való 72 órás polimerizálása és megkeményítése után, félvékony metszeteket vágtunk Leica Ultracut ultramikrotómmal, üveglapokra helyezve, toluidin-kékkel festve és Olympus BX50 mikroszkóppal vizsgálva. Ezután ultravékony metszeteket vágtunk ultramikrotómmal, és rácsra helyeztük a metszeteket. Az ultra-vékony metszeteket urán-acetáttal és ólom-citráttal kontrasztosítottuk, majd JEOL 1200EX-II elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

## AZ eGFP SZÖVETTANI DETEKTÁLÁSA

10 µm vastag kriosztát metszeteket készítettünk többféle gyorsfagyasztott eGFP+ BALB/c szövetből, beleértve az izom, bél és lépszövetet, illetve nyirokcsomót. Ezt 4%-os paraformaldehid PBS oldatban fixáltuk a natív eGFP fluoreszcencia megőrzése érdekében. A sejtmagokat DAPI festéssel jelenítettük meg. A mintákat Olympus BX61 fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk. A képeket CCD kamerával készítettünk, majd alySIS programmal analizáltuk.

## AZ EGFP ÁRAMLÁSI CITOMETRIÁS DETEKTÁLÁSA

Sejteket nyertünk ki a csontvelőből, tímuszból, nyirokcsomóból és perifériás vérből. A limfoid szöveteket mechanikusan diszpergáltuk, egysejt szuszpenziót készítettünk, majd CD4 és CD8 (BD, klón: H129.9 / anti-CD4 és klón 53-6.7 / anti-CD8) festést alkalmaztunk PBS-ben 0,1% BSA és Na-azid jelenlétében). A jelölt sejteket 4%-os paraformaldehid PBS oldatban fixáltuk, FACSCalibur áramlási citometriával mértük és CellQuest Pro programmal analizáltuk (Becton Dickinson). A sejt-populációkat morfológiai kapukkal különítettük el.

## TÍMUSZ EPITÉL SEJTEK SZÉTVÁLASZTÁSA ÉS DÚSÍTÁSA

A tímusz lebenyeket F kollagenáz emésztésnek vetettük alá (C. Hystolyticum, Sigma) 30 percig, majd komplett DMEM-el mostuk. A sejtsuszpenziókat anti-EpCAM1-FITC (klón: G8.8, laborunkban készített monoklonális antitest) jelöltük, majd MACS-pufferrel mostuk, végül anti-FITC mikrogyöngyökkel (Miltenyi Biotec) inkubáltuk és MACS LS oszlopok (Miltenyi Biotec) segítségével szeparáltuk. Az EpCAM+ sejtekből teljes RNS-t izoláltunk, majd cDNS készítése után PCR analízist végeztünk.

## EMBERI PORCSEJTES KÍSÉRLETSOROZAT

A porcsejtek apoptózisának és nekrozisának kiértékeléséhez *in vitro* és *ex vivo* körülmények között enzimatis emésztést követően porcsejt kultúrákat és osteochondralis mintákat vizsgáltunk humán femoralis kondilusból. A két mintát 10 különböző módon kezeltük: glükokortikoidokkal és helyi érzéstelenítőkkel, egyedül vagy kombinációban. A porcsejt kultúrákban az apoptózist festékkizárásos tesztet alkalmazva áramlási citometriával értékeltük ki. Az osteochondralis szövetekben megjelenő apoptózist és nekrozist a TUNEL assay segítségével vizsgáltuk. Ízületi porc biopszia mintákat és osteochondralis explantátumok sorozatát készítettük humán femoralis kondilusból. A porcsejt izolálás céljából eltávolítottuk az összes csontos és lágy szövetet. Az emberi osteochondralis explantátumokat 1×1 cm-es darabokra vágtuk és 4°C-on tároltuk további feldolgozásig (legfeljebb 24 órán keresztül). A porcsejt kultúrákkal végzett kísérletekhez a porcminiókat DMEM tápoldattal (Gibco, Gaithersburg, MD) és 10 U/mL penicillint és streptomycint tartalmazó tápoldatban szállítottuk laboratóriumunkba. A porcminiókat megtisztítottuk és óvatosan 1×1 mm-es darabokra vágtuk. Enzimatis emésztést végeztünk inkubátorban folyamatos keverés mellett kollagenáz II (250 U/mL, Biochrom, Berlin, Németország) és hialuronidáz (37,5 U/mL, Sigma, St. Louis, USA) tartalmú DMEM tápoldatban. A 24 órás inkubáció után a sejteket átszűrtük (100 µm pórusméret) (BD Falcon, Franklin Lakes, USA), PBS oldatban mostuk és tenyésztőlemezre helyeztük speciális porcsejt tápoldatban (Kondrocita Basal Medium; Lonza, Basel, Svájc). Amint a primer tenyészetek elérték a 80%-os

konfluenciát (kb. 7-10 nap), a sejtenyészeteket passzáltuk (0,25% tripszin/EDTA; Sigma). A sejtek porcsejtes fenotípusának igazolása érdekében totál RNS-t izoláltunk a sejtekből a második passzálas után és az aggrecan-termelő aktivitást, illetve a kondrocita-specifikus kollagén szintjét mértük qPCR segítségével. A kollagén és az aggrecan szintje igazolta a kondrocita fenotípust minden esetben. Passzálas követően a porcsejt tenyészeteket véletlenszerűen tíz csoportra osztottuk. Az egyes csoportok sejtei különböző oldatoknak voltak kitéve szoliter (betametazon, prednizolon, lidokain, bupivakain és ropivakain) vagy kombinált kezelésben (betametazon-lidokain, betametazon-bupivakain, betametazon-ropivakain, prednizolon-lidokain), illetve PBS kontrollt is alkalmaztunk 2, 6 és 24 órán keresztül. A kísérleteket háromszor megismételtük különböző donorból származó kondrocita sejtekkel. Minden koncentrációt úgy alkalmaztunk, hogy az ízületi környezetet modellezze egy intraartikuláris térd injekció után az ízületi üreg synovialis burka átlagos mennyiségének alapján (3-4 mL). Az apoptotikus porcsejteket a foszfatidil-szerin expresszió vizsgálatával és áramlási citometria segítségével azonosítottuk. A porcsejtek FITC-jelzett annexin-V és propidium-jodiddal festettük. A porcsejtek mennyiségi analízisét BD FACS Calibur áramlási citometriával (Becton Dickinson, Mountain View, CA) végeztük el, és az apoptotikus/nekrotikus sejtek arányát a Cellquest szoftverrel (BD Biosciences) határoztuk meg. Az osteochondralis explantátum porcból származó porcszövet mintákat szintén eltérő oldatokkal kezeltük 24 órán keresztül. Annak érdekében, hogy a porcszövetben az apoptotikus és nekrotikus sejtek jelenlétét és arányát kiértékeljük, a kezelt osteochondralis explantátumokat TdT alapú dUTP nick-end jelöléssel elemeztük DeadEnd™ Fluorimetrikus TUNEL rendszerrel (Promega, Madison, WI). A metszeteket 40,6-diamidin-20-fenilindol-dihidrokloriddal is festettük. A sejtek életképessége az összes sejt / TUNEL-festett sejt arányában lett kiértékelve. Az összes érték átlag  $\pm$  SD-ként van kifejezve. Az egyes hatóanyagok és a kontroll PBS oldat hatásai között az apoptózis és a nekrosis arányának különbségeit egyutas ANOVA és a Dunnett teszt alkalmazásával határoztuk meg. Az összes elemzést GraphPad Prism 51 programmal végeztük (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA).

## RNS, cDNS KÉSZÍTÉS, qPCR ANALÍZIS

Total RNS izolálást végeztünk az RNAII kit (Macherey-Nagel) segítségével, beleértve egy oszlopon történő DNS emésztési lépést. A cDNS készítést high capacity kit alkalmazásával végeztük (Applied Biosystems). A qPCR analízishez AB7500 és QuantStudio 12k Flex platformot, illetve SYBR green vagy TaqMan kémiát és megfelelő master mixet alkalmaztunk (Applied Biosystems). A génexpressziót a beta-actin szintjéhez normalizáltuk. Az alkalmazott primer szekvenciák további részletei a releváns publikációk anyag és módszer szekciójában érhetők el.

## TAQMAN ARRAY ALKALMAZÁSA

A sejthalálhoz kapcsolódó gének expresszióját egy TaqMan Array Human Apoptosis, Fast 96-well Plate használatával határoztuk meg (Part no.: 4418717, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). A TaqMan Array Plate 92 apoptózishoz kapcsolódó gént és 4 housekeeping gént elemez. Az RT-qPCR Quantstudio 12K Real-Time PCR platformon történt (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) 10  $\mu$ L végtérfogatban, mely TaqMan Fast Advanced Master Mixet (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) és a sejtekből származó cDNS mintát tartalmazta. A génexpressziót az Expression Suite Software (1.1-es verzió, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) segítségével elemeztük. TaqMan Array Human WNT Pathway 96-well Plate (Part. no.: 4414100) mérését is elvégeztük, a fentiekhez hasonló paraméterek mellett. Az array szintén négy housekeeping gént alkalmazott párhuzamosan kontrollként (18S, beta-actin, GAPDH és HPRT).

## HTREC KÓPIASZÁM MEGHATÁROZÁSA DIGITÁLIS PCR HASZNÁLATÁVAL

Vénás vérmintát vettünk Na-citrát tartalmú csövekbe (BD Vacutainer vérvételi cső). Genomikus DNS-t izoláltunk 200  $\mu$ L vérmintából Blood Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany) használatával, lehetővé téve az sjTREC-ek (más néven hTREC) DNS hurok egyidejű izolálását a genomikus DNS-sel. A teljes DNS mennyiségét NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA) eszközzel mértük. Az DNS-t 2.000-3.000 kópia/ $\mu$ L végkoncentrációra hígítottuk. A digitális PCR reakciókat a QuantStudio<sup>TM</sup> 3D Digital PCR Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific) ajánlásának megfelelően végeztük. A digitális PCR mintakeveréket chipre vittük fel, majd a ProFlex<sup>TM</sup> 2x Flat PCR rendszerre töltöttük a gyártó utasításainak megfelelően. A hTREC kópiaszámok abszolút mennyiségi meghatározása QuantStudio 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific) segítségével történt, majd az Analysis SuiteCloud Software segítségével elemeztük az adatokat.

## ANYAGCSERE PROFIL MEGHATÁROZÁSA

A TEP1 sejtek Seahorse metabolikus profilozása érdekében meghatároztuk az optimális sejtszámot, differenciálódási időtartamot és tápoldatot. Ennek megfelelően 15.000 sejt/well kultúrát 9 napig tenyésztettünk standard MDI differenciálódási protokoll szerint. Ezután a Seahorse XF 96 platform (Seahorse Bioscience) segítségével kiértékeljük a sejtek anyagcsere profilját. A sejteket a Seahorse plate-en hagytuk kitapadni overnight. Másnap a sejteket oximéterrel mértük. Az alapértelmezett oxigénfogyasztás felvételét követően a sejteket butiril-cAMP (500  $\mu$ M), oligomicin (2  $\mu$ M) és antimicin (10  $\mu$ M) kezelésnek vetettük alá. Az antimicin-rezisztens oxigénfogyasztást háttérnek tekintettük, és ezt minden értékből kivontuk. Az alapértelmezett oxigénfogyasztást a membrán szivárgást (OCR,

oligomycin kezelés után) számítottuk ki. A glikolízist az extracelluláris savasodás (ECAR, oligomycin előtti) alapján értékeltük ki, és ECAR / OCR értéket számítottunk. A negatív értékeket kihagytuk a számításokból.

## NTA PROTOKOLL

Az exoszómákat tartalmazó preparátumokat Nanosight NS300 készülékkel (Malvern Panalytical Ltd., Malvern, UK) mértük és kvantifikáltuk. Az egyes mintákhoz tartozó kamera beállításokat kézzel állítottuk be a gyártói utasításoknak megfelelően a részecskék optimális vizualizációjának érdekében. A minták injektálása fecskendővel történt. A detektálási küszöböt a maximális érzékenység és minimális háttérzaj szerint állítottuk be. Az összes mérést öt ismétlésben ismételtük minden mintánál, 60 másodperces videók készítésével. A felvételek után az NTA v3.2 beépített szoftverével végeztünk elemzést. Három véletlenszerű mintát választottunk minden csoportból. Minden mintát PBS-ben hígítottunk. Az ideális mérési koncentrációt előzetes tesztekkel határoztuk meg az ideális partikulaszám érdekében (40–100 partikula/képkocka).

## VEZIKULÁK JELÖLÉSE ÉS KIÉRTÉKELÉSE

Az alábbi monoklonális antitesteket használtuk vezikulák immunfluoreszcens jelöléséhez: anti-humán-CD63-FITC (MEM-259) (Thermo Fisher Scientific) és anti-humán-CD81-PE/Cy7 (TAPA-1) (Sony Biotechnology). A részecskék koncentrációját először a jelöletlen EV mintában határoztuk meg. Az exoszóma-szuszpenzió koncentrációja  $3,17 \times 10^{10}$  partikula/mL volt (NTA alapján). Az egyenlő hígítások biztosítása érdekében minta-aliquotokat készítettünk. A különböző koncentrációjú anti-CD63 és anti-CD81 antitesteket 50  $\mu$ L exoszóma szuszpenzióhoz adtuk, hogy 100  $\mu$ L-es térfogatot kapjunk, és egy optimalizált antitest-exoszóma arányt határozzanak meg a vezikulák jelöléséhez. A mintákat (anti-CD63 jelölt; n = 1 és anti-CD81 jelölt; n = 1) sötétben inkubáltuk egy órán keresztül szobahőmérsékleten. A fluoreszcencia mód (FM) során történő fotó-bleaching minimalizálása érdekében az összes jelölt mintát először FM-ben értékeltük, majd fényszórási módban (LSM). Ezután a kiszámítottuk a FM/LSM arányt.

## TOTÁL RNS IZOLÁLÁSA EXOSZÓMÁKBÓL ÉS TELJES miRNome ANALÍZIS

Az exoszómákból Total Exosome RNA és Protein Isolation Kit (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) használatával izoláltunk totál RNS-t a gyártói protokoll szerint. Az ExomiR

szint profilozása Nanostring platformon (NanoString Technologies, Seattle, WA, USA) történt 800 emberi miRNS egyidejű elemzésével a gyártói utasításoknak megfelelően. Mivel az exoszomális miRNS kinyerése alacsony mennyiséget eredményezett, viszont az amplifikáció-mentes módszerek fokozott mennyiséget igényelnek, olyan standard módszert alkalmaztunk, amely során poolozott mintákat használtunk. Minden minta esetében három technikai replikátumot futtattunk. A minőség-ellenőrzés megerősítette a futtatás megbízhatóságát, valamint a miRNS szűrési protokoll validitását és reprodukálhatóságát. Az adatok elemzéséhez és normalizálásához az nSolver szoftvert használtuk. A normalizálást housekeeping módszerrel végeztük, az nCounter miRNS expressziós analízis utasításai szerint. Az első lépésben a NormFinder segítségével azonosítottunk potenciális housekeeping miRNS-eket. Az exportált adatokat NormFinder segítségével rendeztük átlag szerinti sorba minden minta esetében, és minden olyan miRNS-t eltávolítottunk, amelynek átlaga kevesebb volt, mint 50, az összes mintában. Az így kapott adatok alapján meghatároztuk a potenciális housekeeping miRNS-eket. A normalizálást végül öt stabilan kifejeződő miRNS geometriai közepének (hsa-miR-495-3p; hsa-miR-302d-3p; hsa-miR-3144-3p; hsa-miR-612; hsa-miR-548ar-5p) használatával végeztük. A minőség-ellenőrzés kielégítette a gyártó által meghatározott követelményeket.

## miRNS TARGET PREDIKCIÓ ÉS ÚTVONAL ANALÍZIS

Egy tucat hasonlóan deregulált exomiR-t azonosítva fiatal és idős aktív egyénben, elvégeztük az miRNS-mRNS jelátviteli útvonalak interakcióinak vizsgálatát az online elérhető mirPath v.3 program segítségével. A mirPath v.3 és a TarBase v7.0 adatbázisait alkalmaztuk humán mRNS target predikcióhoz. A p-érték és a MicroT küszöbérték alapértelmezett maradt (0,05 és 0,8). FDR korrekciót is alkalmaztunk.

## VIZSGÁLATI ALANYOK AZ ÉLETMÓDVÁLTÓ PROGRAMBAN

Az életmód program egy egyetemi kísérlet volt, amely a fizikailag inaktív egyetemi hallgatók testmozgásának elősegítését célozta meg. Az edzések a Sporttudományi és Testnevelési Intézetben zajlottak. A program a PTE Etikai Bizottsága jóváhagyta (6439/2016). Az összes résztvevő a Helsin ki Nyilatkozatnak megfelelően írásban nyilatkozott beleegyezéséről, mielőtt elkezdték az életmód programot. A résztvevőket a közösségi médiában történő hirdetések révén toboroztuk. A bevonási kritérium az volt, hogy az előző 6 hónapban nem vehettek részt rendszeres testmozgásban vagy kontrollált étrend programban, nem voltak betegek (metabolikus, kardiovaszkuláris, hipertónia vagy súlyos sérülés), és mindkét nemet bevontuk a vizsgálatba (n = 25), az átlagéletkor 24,95 év volt ( $\pm 4,04$ ). A program végén 14 résztvevő teljesítette az 6 hónapos életmód program követelményeit, azaz heti három alkalommal részt vett az edzéseken.



## KOMBINÁLT ÁLLÓKÉPESSÉGI ÉS STATIKUS EDZÉSI PROGRAM

Az életmódbeli programot úgy alakítottuk ki, hogy mind az állóképességet, mind az erőt fejlessze, amit 60 perces edzéseken valósítottunk meg, háromszor egy héten, hat hónapon át. Minden edzést négy szakaszra osztottunk: 10 perc bemelegítés, 30 perc erősítő edzés, 20 perc aerob edzés és 10 perc nyújtás / levezetés. A fizikai aktivitás intenzitása a résztvevők aktuális fitness szintjéhez igazodott:  $\leq 65\%$  HRmax az aerob edzéshez és  $\leq 85\%$  HRmax az erősítő edzéshez, ahol HRmax = 220 – életkor (években). A Polar Team rendszer szívritmus (HR) monitorait minden második héten használtuk. A résztvevőket arra kértük, hogy a hat hónapos életmód program alatt tartsák megszokott étrendjüket és egyéb napi aktivitási szintjüket.

## MÉRÉSEK AZ ÉLETMÓDVÁLTÓ PROGRAM ALANYAIN

A mérés a tréningprogram előtt (0. hónap), illetve 3 és 6 hónappal később zajlottak le. A 3 és 6 hónapos értékeket normál értékeknek állítottuk be, majd Z-score-ként dolgoztuk fel. A testzsír% és izomtömeg% mérése bioimpedancia analizátorral (Omron, HBF-516B, Budapest, Hungary) történt. A szisztolés és diasztolés vérnyomás mérése (Omron M10-IT) 5 perc nyugalmi állapot után történt. A fizikai állapotot hat perces séta tesztel (6MWT) értékeltük. Az  $VO_2$ max (L/perc) értéket relatív  $VO_2$ max (ml/kg/perc) értékre konvertáltuk. Az aktivitás monitorozására triaxiális akcelerométeren alapuló módszert alkalmaztunk az Actigraph GT3X+ készülékkel (Actigraph, Pensacola, FL, USA). Az Actigraph 60 másodperces időintervallumokban rögzítette a mozgást. A résztvevőket utasítottuk arra, hogy a vizsgálati időpontokban folyamatosan viseljék az Actigraphot éjjel-nappal 7 egymást követő napon. Az Actigraph méréseket nem végeztük minden résztvevő esetében azonos napokon, mivel a készülék korlátozott számban állt rendelkezésre, de az összes felvétel megfelelt az 1 hetes időintervallumnak. Az elemzésből kizártuk azokat az adatokat, amelyek rögzítése során a résztvevők nem viseltek 7 egymást követő napig a készüléket. Az Actigraph felvételeit az ActiLife 6.10 szoftverrel dolgoztuk fel (Actigraph), és a korábbi kísérletek alapján határoztuk meg a cutoff értékeket. A szívritmus R-R intervallumot a tréningek 2. hetében regisztráltuk Polar Team System (Polar Electro Oy, Kempele, Finnország) segítségével. Az adót a résztvevők mellkas közepénél, a sternum csúcsa alatt hordták. A szívritmus monitorozás a javaslatoknak megfelelően történt. Röviden az alanyokat 5 percre leültettük a nyugalmi (HR) szívritmus mérése érdekében. Ezután minden alany 30 perces rezisztencia edzést végzett, amit 20 perces aerob edzés követett, folyamatos HR monitorozás mellett. Végül a HR-t további 5 percig folyamatosan mértük az adaptáció méréséhez. Az eredményeket a Polar Pro Trainer 5 és a Kubios HRV program szolgáltatatták.

## VÉRMENTÁK GYŰJTÉSE ÉS KIÉRTÉKELÉSE AZ ÉLETMÓDVÁLTÓ PROGRAMBAN

Reggeli éhgyomri vérvétel történt. Az alanyok a vizsgálatuk előtti napon edzés-szünetet tartottak. A sejtvesztés vizsgálatához K-EDTA tartalmú csöveket használtunk. Adalékanyag nélküli csöveket használtunk szérumban C-reaktív protein (CRP) és a kortizol tesztekhez. A vér gyűjtése után a szérumban centrifugával választottuk el (10 min, RT, 1.500 rpm). A vörösvérsejt-paramétereket egy Cell-Dyn 3700 rendszerű multiparaméteres automata hematológiai analizátorral (Abbott Diagnostics, Abbott Laboratories, Abbott Park, IL, USA) mértük. A CRP-t a Roche Diagnostics Cardiac C-Reactive Protein (Latex) High Sensitivity turbidimetriás immunoassay tesztjével (Cobas 8000 Modular Analyzer, Roche Diagnostics, GmbH, Mannheim, Németország) mértük a gyártói utasításoknak megfelelően. A kortizolt a Beckman Coulter Cortisol RIA Kit (IM1841) tesztjével (RIA-mat 280 automatizált analizátor, Stratec GmbH, Birkenfeld, Németország) mértük szintén a gyártói utasításoknak megfelelően.

## MESTERSÉGES NEURONHÁLÓZATOS ADATELEMZÉS

Az adathalmaz kiértékelése a Neurosolutions 6 (Neurodimension Inc.) ANN szoftverrel történt Jordan/Elman típusú hálózattal. Mivel ez a fajta hálózat magas adaptív képességgel rendelkezik, kiterjeszti az alapvető többrétegű perceptron modellt korábbi értékekre való emlékezéssel. A hálózat feltárhatja az input és az output faktorok közötti rejtett összefüggéseket, akkor is, ha nem mutatnak nyilvánvaló kapcsolatot egymással. A hálózat tanításához 14 adatkészletet (az életmódprogram résztvevőit) használtuk 10.000 tréning munkamenet során, az átlagos négyzetes hiba 0,003 volt. A szignifikancia meghatározásához egyszerű t-próbát használtunk.

## ÉLETTANI ÉS MOLEKULÁRIS ADATOK BIOSTATISZTIKAI KIÉRTÉKELÉSE

Az adatok alapján euklidészi távolság mátrixot számoltunk. A hierarchikus csoportosítási módszerrel teljes agglomerációt alkalmaztunk a minta elemzésére. Az ANN kulcsparaméterei (fizikai aktivitás, inzulin, hTREC) alapján dendrogramokat hoztunk létre. Az alanyok mintázatának vizualizálásához 3D ábrákat is használtunk az NCSS 12 statisztikai szoftver segítségével.

## STATISZTIKAI ANALÍZIS

Az adatok elemzéséhez az abszolút változást használtuk a kiindulási szint különbségének mérésére, mivel a relatív változás, ellentétben a irodalomban javasolttal, statisztikailag nem hatékony. Az adatokat Z-pontokra konvertáltuk és az átlagokat  $\pm$  szórással mutattuk be. Számos tanulmány kimutatta, hogy a K-mean klaszteranalízis az emberi reagálóképességet torzítás nélkül mutatja. A K-mean klaszteranalízis (SPSS 22) segítségével két csoportot azonosítottunk: alacsony válaszadók (LR) és magas válaszadók (HR). A biológiai javulást mutató egyének HR-nek neveztük, míg azokat, akiknél minimális javulás vagy romlás volt, LR-nek neveztük. Miután azonosítottuk a két csoportot (LR és HR), ezeket One-Way ANOVA-val teszteltük, amelyhez  $p < 0,05$  értéket használtunk. A megerősítés érdekében teljesítőképesség-elemzést is végeztünk.

kvell.krisztian\_95\_23

# EREDMÉNYEK ÉS MEGBESZÉLÉS

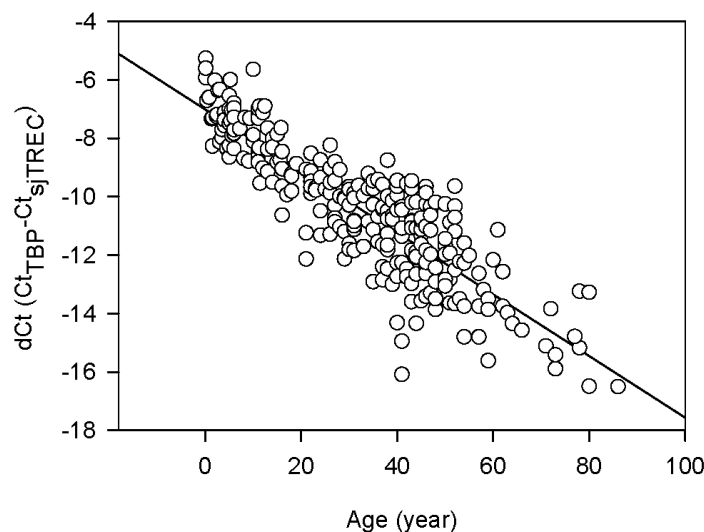
## FUNKCIONÁLIS KORMEGHATÁROZÁS

(közlemény: Garai et al. *Front Physiol.* 2019)

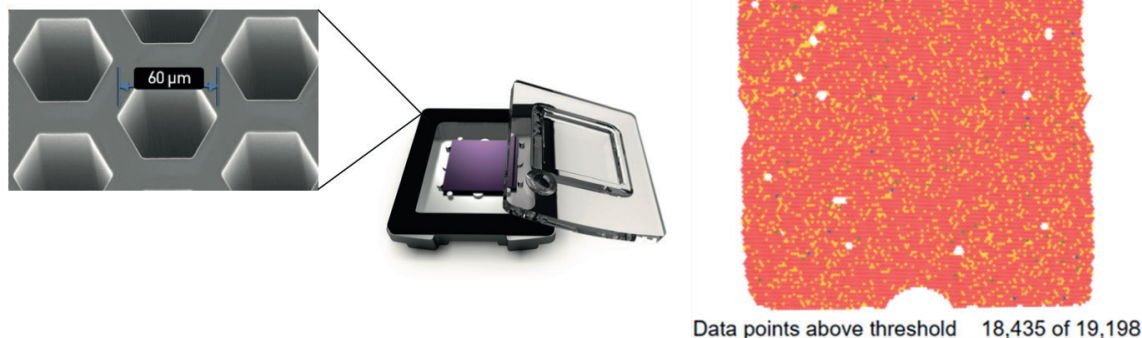
Ahogy a bevezetőben ismertetésre került, a tímusz olyan központi immunrendszeri szövet, mely már korán az öregedés jeleit mutatja. Egérben kb. 1 hónapos kortól, emberben pedig kb. 5 éves kortól szövettani szinten már megfigyelhetők az eleinte mérsékelt degeneratív folyamatok, melyek progresszív mértéket öltenek a pubertáskori hormonális változások (szexuál-szteroidok termelődése) után. Ennek eredményeként emberben 50 éves korra a tímusz funkcionalitása (a friss naiv T-sejt termelés) kb. az eredeti volumen 20%-ra esik vissza. (101, 102) A friss naiv T-sejtek azonban nem csak kisebb számban keletkeznek, hanem szelekciójuk is hibás módon zajlik. Idős korban ezért is több a fertőző, daganatos és autoimmun megbetegedés. (103)

A tímusz öregedésének üteme egyénenként más és más, jelentős eltérés figyelhető meg a genetikai háttér, a korábbi fertőző betegségek, hormonális, kémiai és fizikai behatások, stressz függvényében. Ezért a tímusz funkcionális kora jelentős egyéni variációt mutat az életkor alapján várt értékhez képest. Munkacsoportunk továbbfejlesztett egy mérő módszert, mely alkalmas a tímusz biológiai funkcionális korának precíz meghatározására akár egy csepp beszáradt vérből is. Ennek alapja, hogy a friss naiv T-sejtek kialakulásakor a T-sejt receptor (TcR) gének átrendeződésének folyamata során egy kis méretű DNS hurok melléktermék keletkezik (hTREC: human T-cell receptor excision circle). (104) Ez a hTREC DNS hurok a keletkező T-sejtekben fennmarad és a keringésbe kerülő friss naiv T-sejtekben kimutatható. A hTREC kópiaszám arányos a friss naiv T-sejt termeléssel, szintje erősen csökken a tímusz öregedésével (**5. ábra**). (105-107)

A módszer alapja az egyszerre specifikus, érzékeny és precíz kópiaszám meghatározás, melyet munkacsoportunk harmadik generációs digitális PCR platform segítségével végzett multiplex Taqman kémiát használva, endogén RnaseP géntrollhoz és ROX festékhez normalizálva. A plat-



**5. ábra:** hTREC kópiaszám (ddCT érték) és az életkor összefüggése. Irodalmi forrás: Xeu-Ling Ou et al, *PloS ONE*, 2012



**6. ábra:** QuantStudio 3D PCR chip sémás szerkezeti képe (**bal**) és szkennelt képe (**jobb**). *Forrás: Thermo Fisher Scientific (bal) és saját szkennelt kép (jobb)*

form sajátossága, hogy genomikus DNS-ből dolgozva (mely izolálás során a hTREC DNS hurkok szintén izolálódnak) chipenként 20.000 párhuzamos reakció elvégzése révén precíz detekciót biztosít alacsony kópiaszám esetén is, minimális (2%) hibahatár mellett (**6. ábra**).

A hTREC DNS hurkok stabilak, szűrőpapírra kicseppentve és bezárítva napokig szobahőmérsékleten is tárolhatók, szállíthatók, a mérés eredményét befolyásoló degradáció nélkül is (DBS: dried blood spot). A mintavételhez elegendő 1 csepp (kb. 50 µl) ujjbegy vér, mivel a módszer érzékeny, specifikus és precíz. A fentiek eredményeként a hTREC.alapú tímusz funkcionális kormeghatározás elvégezhető centralizált szolgáltatásként, elegendő postai úton beküldeni a szűrőpapíron beszáradt ujjbegy-eredetű vérmintákat. (108) Mivel a T-sejtek fejlődése a tímuszban kb. 1 hónapot vesz igénybe, dinamikáját tekintve ennél sűrűbb időbeli felbontásban nem szükséges vizsgálni a hTREC kópiaszámot. Az újszülöttkori immunstátusz meghatározás már számos országban (pl. Anglia, Ausztria, Svédország, Szlovákia, Kalifornia állam stb.) rutinként alkalmazott diagnosztika (109, 110) A hTREC kópiaszám meghatározás alkalmas a T-sejtes hiányállapot korai felismerésére, mely lehetővé teszi az ilyen egyének mielőbbi azonosítását, a szükséges kezelés (pl. csontvelő-átültetés) megszervezését. (111) A korai diagnózis azért is fontos, mert az ilyen egyének esetében magas kockázatot rejt az élő, attenuált kórokozót tartalmazó oltások (pl. BCG oltás) alkalmazása. (112) A módszer könnyen elvégezhető multiplex formában (a platform 4 fluoreszcens csatorna egyidejű használatát is lehetővé teszi) és egyidejű hKREC kópiaszám mérésére is hasonló módon alkalmazható, mely a B-sejtek csontvelői fejlődésének (BcR génátrendeződés) egy szintén DNS hurok melléktermékén alapul. Vagyis egyazon mintából és méréssel a T- és B-sejtes immun-státusz is könnyen és gyorsan meghatározható. (113) További diagnosztikai terület lehet az élsportolók edzés-terhelésének követése (a túledzés, mint stressz okozta átmeneti immunszuppresszió kimutatása céljából), illetve a fizikai sugárterhelés biológiai hatásának kimutatása, mivel a tímusz erősen érzékeny a sugárzásra is és hatására nagy mértékben csökken a friss naiv T-sejt termelés, de akár csontvelő-átültetést követően a tímusz regeneráció vagy kemoterápia során a tímusz károsodás kimutatására is alkalmas a mérőmódszer. (114, 115) Mivel igen jelentős egyéni eltérések mellett (eltérő szintről indulva, eltérő ütemben haladva), de minden felnőttben progresszív módon zajlik a tímusz öregedése, kiemelt fontosságú volt egy precíz mérőmódszer felállítása a tímusz funkcionális korának objektív kiértékelés érdekében. Ezt követően kezdtük meg kutatásainkat a tímusz öregedésének jellemzésében, az egyes

gyorsító és lassító tényezők azonosításában, potenciális kezelés fejlesztésében, pilot próba-jellegű termelés irányában.

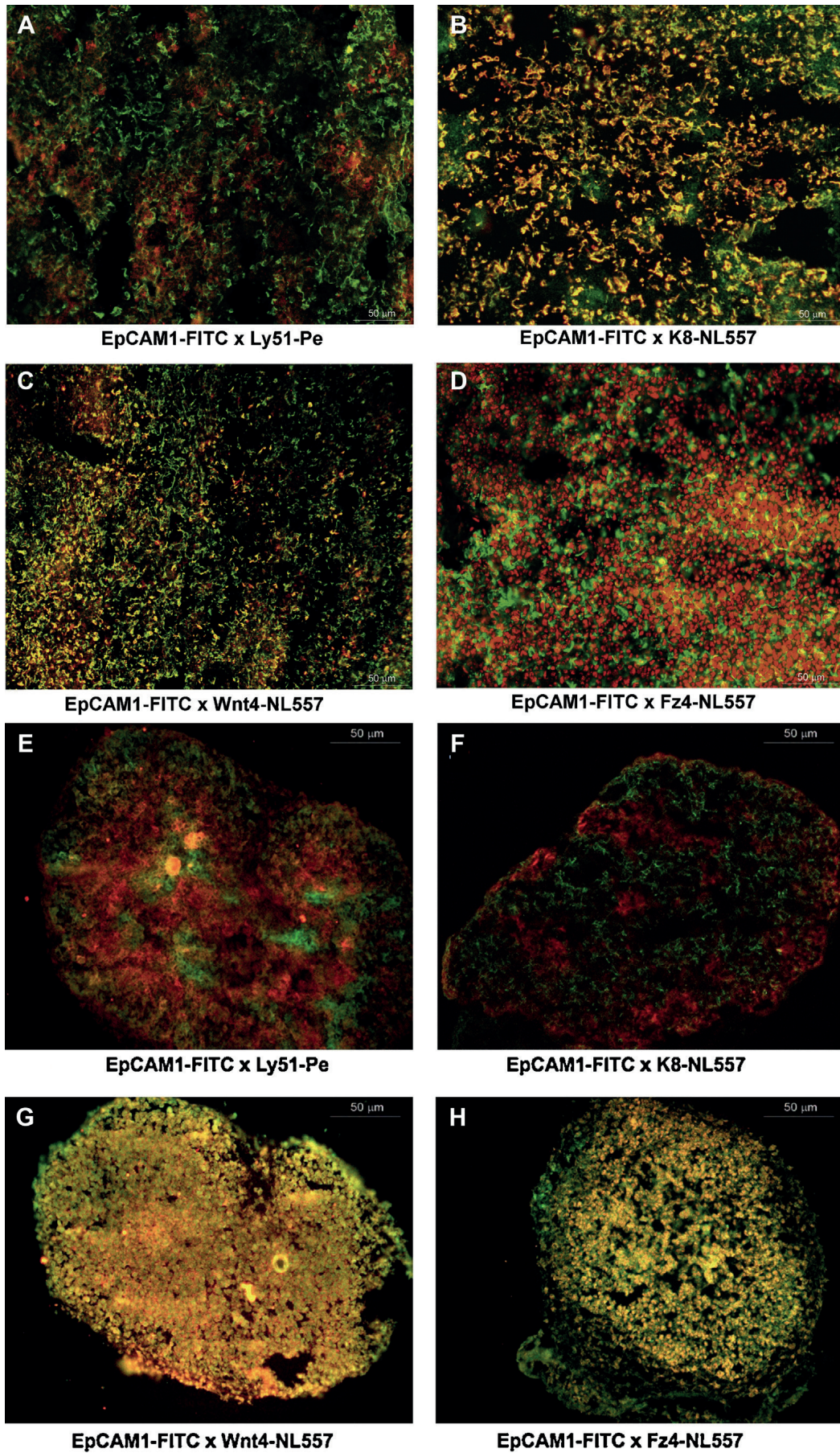
## AZ ORGANOGENEZIS MOLEKULÁRIS TÉNYEZŐI

(közlemény: Kvell et al. *Immunobiology*, 2014)

A tímusz embrionális fejlődése hasonló módon zajlik egér és ember esetében, de más időskálán. Az időbeli különbségek ellenére, más munkacsoportok és saját eredményeink szerint is a sok hasonlóság miatt az egér jó modell szervezet a tímusz fejlődésének követésére, valamint lehetőséget ad molekuláris intervenciók biológiai hatásának vizsgálatára. (116) Egér embrióban a teljes 21 napos fejlődési ciklus során a 11. napon (E11) jelenik meg a tímusz epitél alapállománya, melyet egy nappal később (E12) már benépesítenek a fejlődő T-sejt előalakok, és további 3 nap után (E15) már kialakul a jellemző tímusz epitél cortex / medulla szegregáció is, biztosítva a későbbi T-sejt fejlődéshez szükséges elkülönült szöveti kompartmenteket. Emberi magzatban 40 hét a gesztációs periódus. Az 5. héten (W5) megjelenik a tímusz epitél alapállománya, s két héttel később (W7) megtelepednek a T-sejt progenitorok is, majd fokozatosan kialakul a cortex / medulla szegregáció, a későbbi T-sejt fejlődés színtere. (117) Munkacsoportunk időzített terhes egér embriók E15-ös tímusz lebenyeit és genetikai tanácsadást követően abortált emberi magzat W15-ös tímusz lebenyeit hasonlította össze szövettani festéssel. Mindkét fajban és időpontban jól megjeleníthető a tímusz epitél alapállománya EpCAM1 (pán tímusz epitél marker), és a cortex / medulla szegregáció Ly51 és Keratin 8 (preferenciálisan medulláris tímusz epitél marker) festéssel (**7. ábra**).

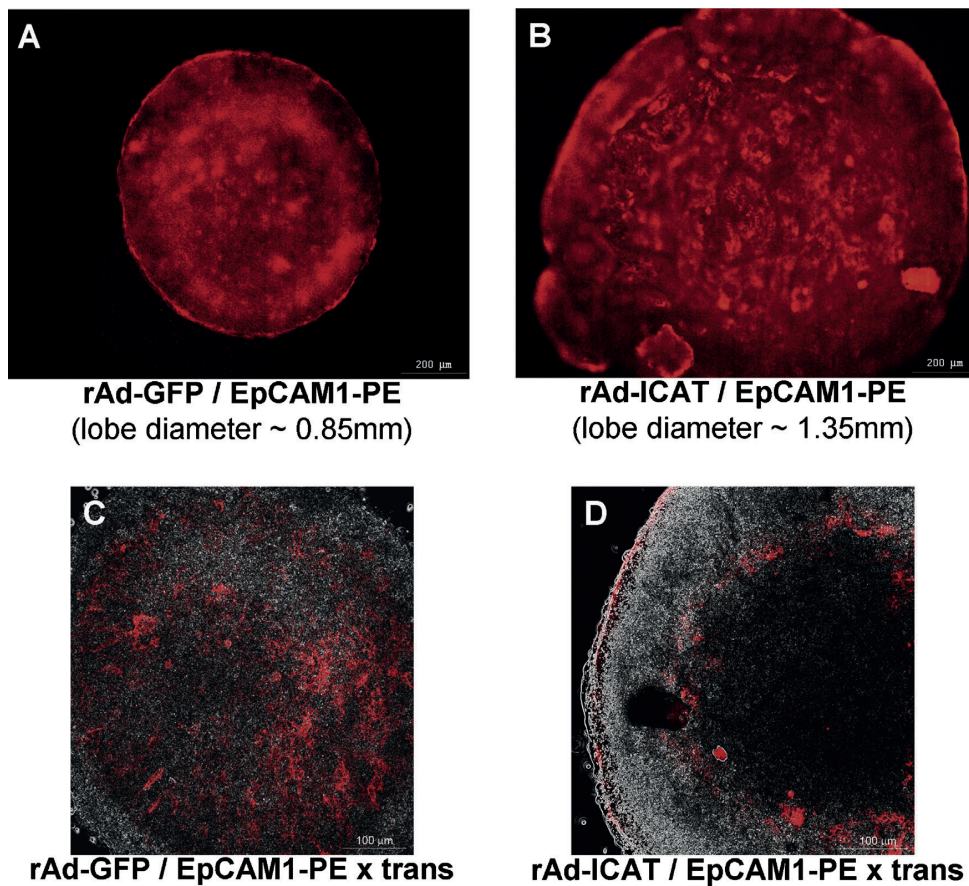
A sejtfelszíni markerek mellett a szekretált ligandok és azok receptorainak jelenlétét is vizsgáltuk. A tímusz epitél sejtek és a T-sejt előalakok kölcsönösen nyújtanak egymás számára fejlődési, differenciációs és túlélési jeleket, melyek között kiemelt fontosságú a Notch / DLL receptor / ligand jelátviteli tengely, illetve a Wnt / Fz receptor-ligand jelátviteli útvonal, valamint a BMP jelátvitel aktivitása is. (118-122) Munkacsoportunk korábbi eredményei alapján figyelmünk fókuszába egy olyan szolubilis glikolipoprotein került (Wnt4), mely közvetlenül irányítja a tímusz epitél hálózat kialakulását és identitását meghatározó kulcsfontosságú transzkripciós faktort (FoxN1). (123) A Wnt4 hatását is (akárcsak más Wnt glikolipoproteinek esetében) a célsejt felszínén levő Frizzled receptor és a jelenlevő LRP koreceptor együttese határozza meg. Irodalmi adatok és saját korábbi mérések alapján a Fz4 egy az embrionális fejlődésben kiemelten fontos Wnt receptor. Ezt bizonyítják eredményeink, mely alapján mind a Wnt4 ligand, mind a Fz4 receptor egyaránt kimutatható E15 egér embrionális és W15 emberi magzati tímuszban (**7. ábra**).

Irodalmi adatok alapján a Wnt4 egyik direkt célgénje a FoxN1 transzkripciós faktor, mely közvetlenül irányítja a tímusz epitél sejtek embrionális fejlődését és differenciációját, valamint meghatározza felnőttkori identitásukat is. A Wnt4 / FoxN1 tengely aktivitásának fontosságát az embrionális fejlődés során annak gátlása révén igazoltuk egy intracelluláris kompetitív antagonistá molekula (ICAT) alkalmazása révén. (124) Az ICAT-kódoló adenovirális vektorokkal a tímusz epitél sejtekben blokkolva a Wnt4 hatását (adenovírus vektorok nem fertőznek T-sejt előalakokat) az erősen gátolta



7. ábra: Humán W15 (A-D) és egér E15 (E-H) magzati tímusz metszetek immunfluoreszcens festése. Forrás: Kvell et al. *Immunobiology*, 2014

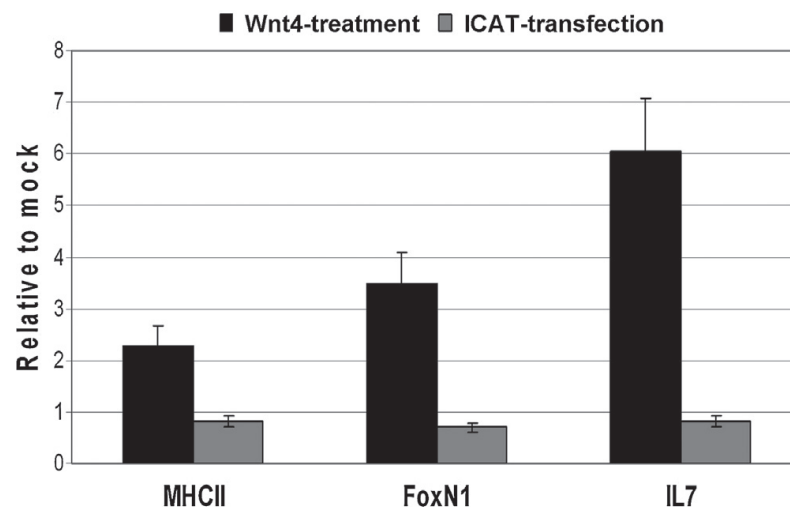




**8. ábra:** Kontroll (A/C) és ICAT (B/D)-fertőzött E12 tímusz organoidok immunfluoreszcens festése. *Forrás: Kvell et al. Immunobiology, 2014.*

az embrionális tímusz fejlődését. A Wnt jelátvitel ICAT általi kiiktatásának hatására az E12 korból származó tímusz organoidok üres hólyagokká váltak, melyek belseje alig tartalmazott sejtet. Vagyis ICAT hatására az aktív Wnt jelátvitel hiányában erősen torzul a tímusz organoid fejlődése (**8. ábra**)

Nem csak morfológiai fejlődési zavart okoz az ICAT általi Wnt jelátvitel blokkolása. Molekuláris szinten is csökkenti, a Wnt4-hez képest ellentétes hatást vált ki jellegzetes intracelluláris (FoxN1), sejtfelszíni (MHCII) és szekretált (IL7) tímusz epitél fehérjék expressziójának elnyomása révén, mely szintén a tímusz fejlődésének elmaradását igazolja (**9. ábra**).



**9. ábra:** Kontroll (1-es baseline), Wnt4-kezelt és ICAT-fertőzött E15 tímusz organoidok mRNS expressziója. *Forrás: Kvell et al. Immunobiology, 2014.*

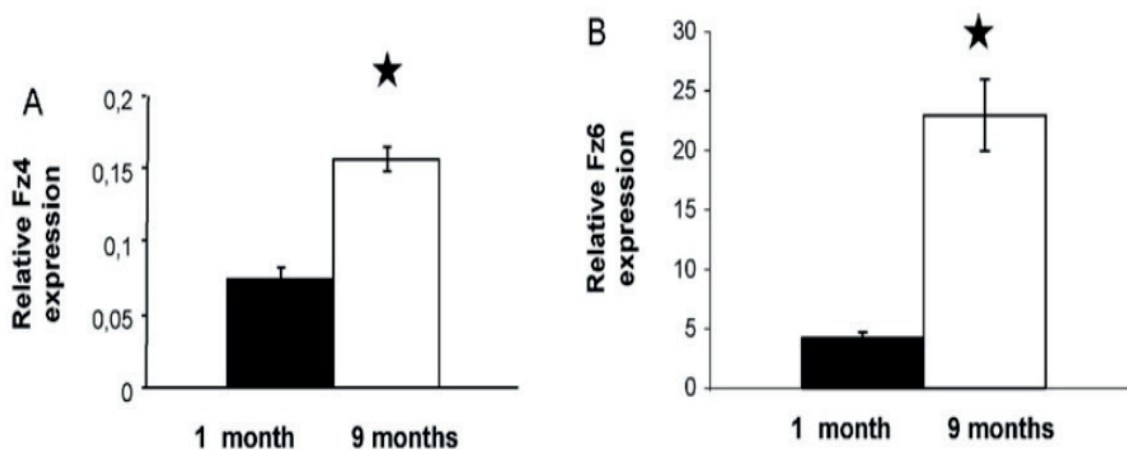
Munkánk során sikerült rávilágítanunk egy másik transzkripciós faktor, a TBX-1 jellegzetes, a tímusz életében kettős, ambivalens szerepére. Embriionális fejlődésben a TBX-1 kulcsfontosságú a tímusz harmadik garatívból történő lefűződéséhez, kialakulásához. Hiányában komplex fejlődési defektus, DiGeorge szindróma, egyebek mellett tímusz aplázia alakul ki. (125-127) Azonban a felnőttkorban ugyanezen TBX-1 transzkripciós faktor egy egészen más kontextusban kerül előtérbe, a beige zsírszövet kialakulásáért és identitásáért felelős funkciója révén. Ezzel kapcsolatos részletes eredményeink egy későbbi fejezetben kerülnek bemutatásra.

## AZ ÖREGEDÉS JELÁTVITELI TÉNYEZŐI

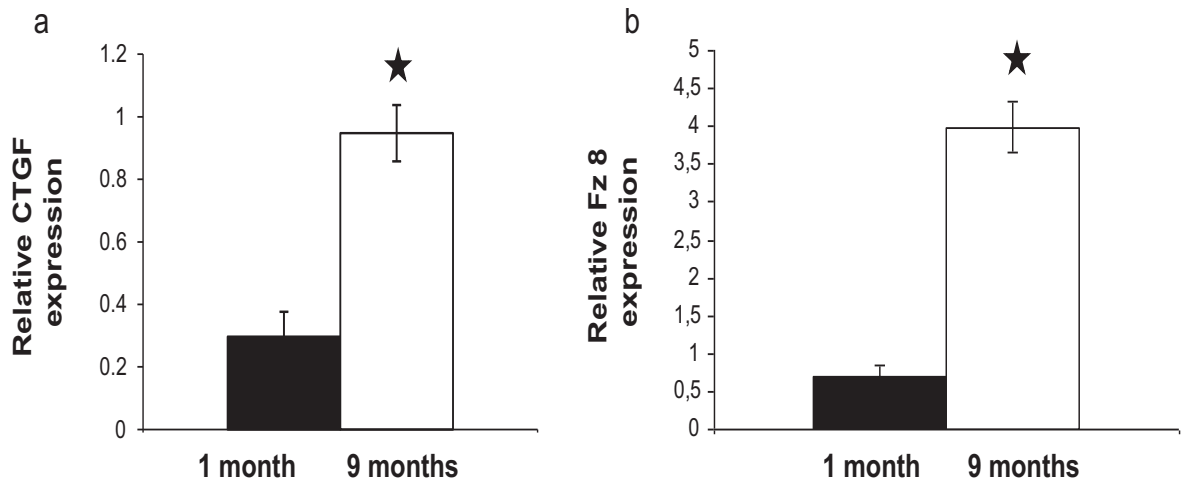
(közlemény: *Varecza et al. Mech. Ageing and Dev. 2011*)

A tímusz epitél sejtek Wnt jelátviteli folyamata mind receptoriális, mind intracelluláris, mind szekretált szinten összetett, és az öregedés során jelentős változásokon megy át, irodalmi adatok és munkacsoportunk eredményei alapján egyaránt. (128-132) Fialat korban (pl. 1 hónapos fiatal felnőtt egerben vizsgálva) a jelenlevő Wnt4 főként Fz4 receptoron keresztül fejt ki aktiváló hatást a Wnt / beta-catenin jelátviteli tengelyen, ezzel fenntartva a FoxN1 transzkripciós faktor expresszóját és az epitél sejtek identitását. Az öregedés során sokrétű változások történnek. Egyrészt csökken a rendelkezésre álló szabad Wnt4 glikolipoprotein szintje. (133) Ezzel receptoriális szinten lépést próbál tartani a sejtes jelátvitel a fokozott Fz4 és Fz6 expresszió révén, azonban az utóbbi felé billen el az egyensúly (**10. ábra**). (Egerben 9 hónapos korban vizsgálva már jól megjeleníthetők molekuláris szinten a tímusz öregedésének jellegzetességei)

A Fz6 receptor azonban gátló jellegű jelátvitelt képvisel a Wnt / beta-catenin tengelyen, mely a fokozott NLK és TAK kináz aktivitás révén TCF foszforilációt és így a Wnt / beta-catenin jelátviteli útvonal gátlását idézi elő. Ezzel párhuzamosan megnövekszik a szekretált CTGF, illetve receptorának a Fz8 expressziós szintje is, melyek együttesen visszahatva a tímusz epitél sejtekre tovább erősítik az öregedés molekuláris folyamatát (**11. ábra**).

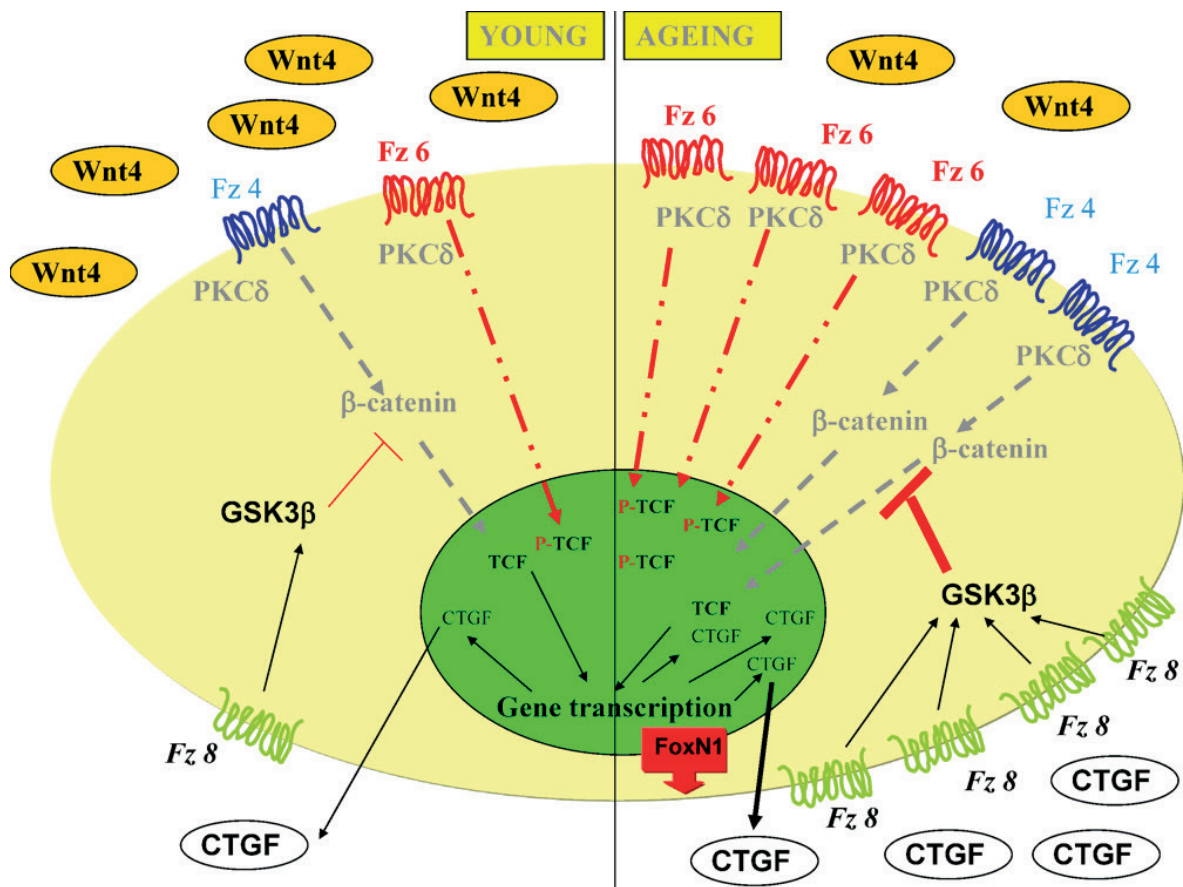


10. ábra: A Fz4 aktiváló és Fz6 gátló receptorok szintjének változása koraal, mRNS expresszió. Forrás: *Varecza et al. Mech. Ageing and Dev. 2011*.



11. ábra: CTGF gátló ligand és Fz8 gátló receptor szintjének változása korral, mRNA expresszió. Forrás: Varcza et al. Mech. Ageing and Dev. 2011.

Összességében végső soron nem csak közvetlenül a csökkenő Wnt4 szint, a következményes FoxN1 expresszió és a gyengülő tímusz epitél identitás felelős a tímusz öregedéséért, hanem közvetve a megváltozó jelátviteli kontextus (Fz6 gátlás, illetve a CTGF/ Fz8 túlsúly) is gyengíti az epitél sejtek identitását, ezzel együttesen utat nyitva az öregedés degeneratív folyamatainak, a tímusz zsíros involúciója számára (12. ábra).



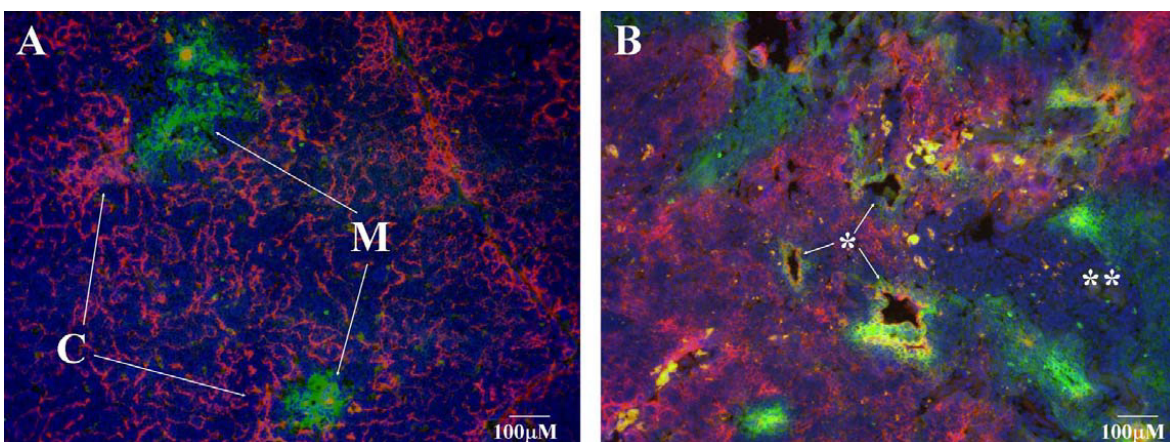
12. ábra: A tímusz epitél sejtek jelátviteli folyamatainak változása korral. Forrás: Varcza et al. Mech. Ageing and Dev. 2011.

## ENDOGEN ZSÍROS INVOLÚCIÓ

(közlemény: Kvell et al. PloS ONE 2010)

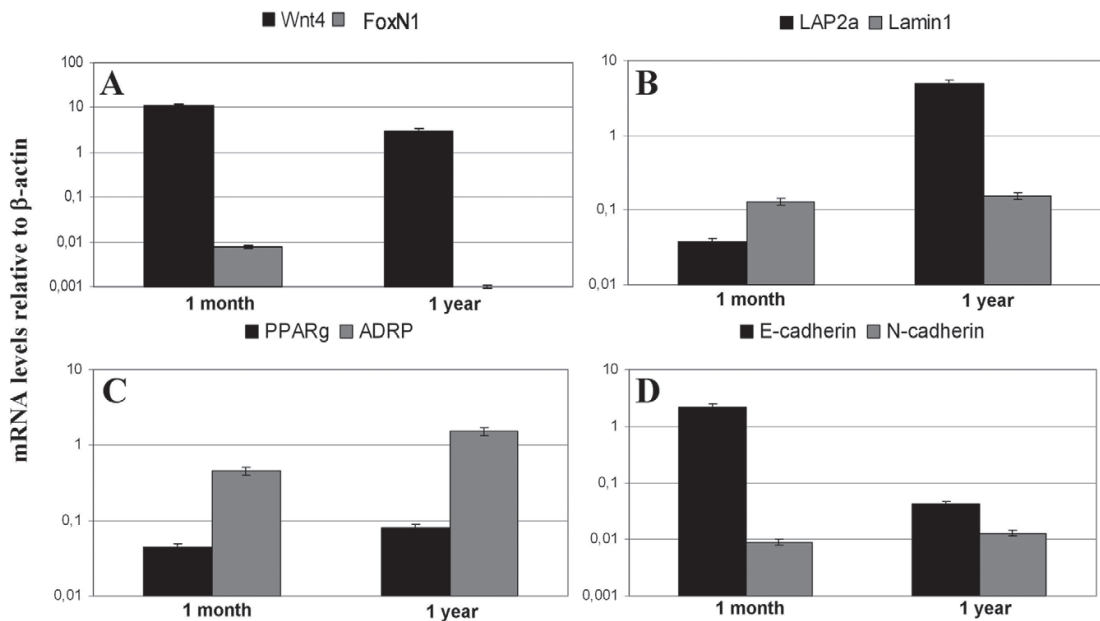
A tímusz alapállományát biztosító epitél hálózat kortikális és medulláris állományra osztható, dedikált funkciókkal. (134) A kortexben kezdődik a timociták fejlődése, itt zajlik le a TcR-gének átrendeződésével kapott antigén-specifikus receptor első, kompatibilitási tesztelése: a pozitív szelekció. A medulla állományában folytatódik a TcR tesztelése, kizárva a saját struktúrákhoz nagy affinitással kötődő klónokat: a negatív szelekció. Alternatívaként regulátor T-sejteké programozhatók, melyek a periférián a tolerancia fontos sejtes elemei helyi TGF-beta és IL-10 termelésük révén. (135) Az öregedés során az epitél hálózat fellazul, zsugorodik, helyét zsírszövet tölti ki, ezért a tímusz öregedését zsíros degenerációnak, involúciónak is nevezik. (136) A folyamat során tapasztalható a fiatalkorban még szigorúan szétválasztott kortikális és medulláris szegregáció rendjének felbomlása, epitél-mentes területek és vakuolumok megjelenése (**13. ábra**).

A zsírszövetek megjelenését a PPARgamma transzkripciós faktor irányítja, több munkacsoport igazolta központi szerepét a folyamatban. (137) A tímusz esetében is valószínűsíthető volt a PPARgamma központi szerepe a zsíros degeneráció vagyis a tímusz öregedés folyamatában, melynek vizsgálata munkacsoportunk fókuszába került. Munkacsoportunk korai kutatásai a PPARgamma mellett egy társ-transzkripciós faktor, a LAP2alpha szerepét is vizsgálta a tímusz öregedése során. A LAP2 (korábban timopoetin) molekulacsalád hét tagja közül az első (alpha) kivételével mind a maghártya stabilitását biztosító strukturális elemek. (138, 139) A család első tagja (alpha) azonban eltérő viselkedést mutat, nem stabilizáló-elemként viselkedik, hanem a sejtciklusban, sejt-differenciációban vesz részt, meglehetősen promiszkuus módon, társ-transzkripciós faktorként működve. (140-142) A LAP2alpha citoplazmatikus átíródást követően a sejtmagba transzportálódik PKC-dependens módon, és irodalmi adatok szerint fibroblaszt szövetekben elősegíti azok zsírsejt irányú differenciációját, közvetlenül a PPARgamma és közvetve az ADRP célgének aktiválásán keresztül. (143, 144) A fentieket és a korábbiakat megerősítik a primer egér tímusz epitél sejteken fiatal és idős korban elvégzett összehasonlító méréseink, melyek szerint korral csökken a Wnt4 és FoxN1 expresszió



**13. ábra:** A tímusz epitél kompartmentek (C: cortex, M: medulla) szigorúan elkülönülnek egérben fiatal korban (A: 1 hónapos kor), mely az öregedés során fellazul és eltűnik (B: 1 éves kor). Megfigyelhetőek lesznek epitél-mentes területek és vakuolumok is (csillaggal jelölt területek). EpCAM1-FITC és Ly51-PE immunfloreszcens festés.

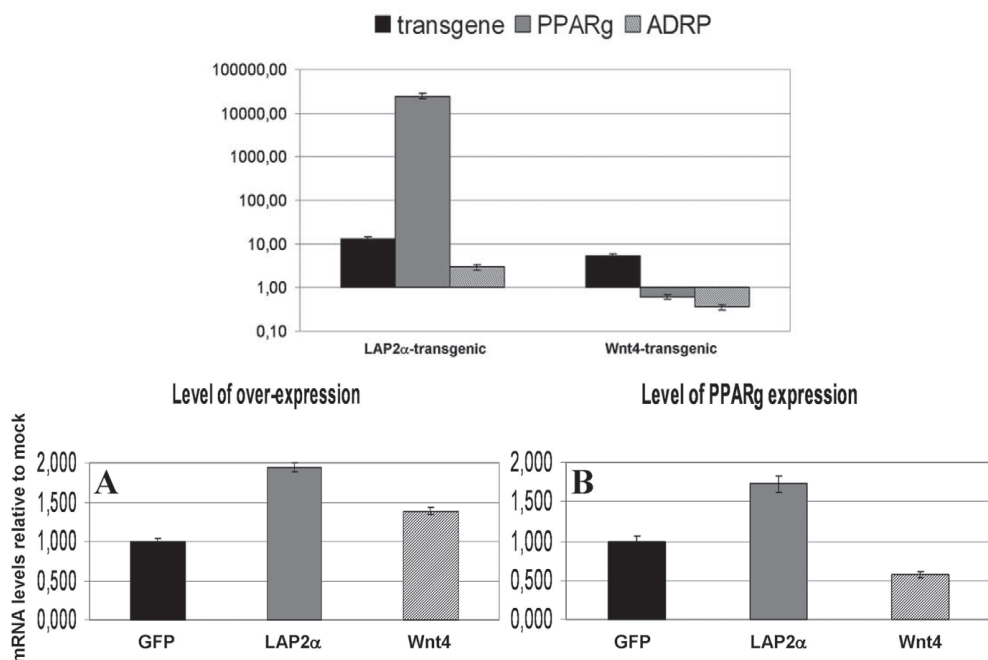
Forrás: Kvell et al. PloS ONE. 2010



**14. ábra:** Egérben korral (1 hónapos fiatal és 1 éves idős kort összevetve) csökken az epitél identitás (A: Wnt4 és FoxN1 szint), emelkedik az adipogén behatás (B: LAP2alpha szint), megkezdődik a zsíros degeneráció (C: PPARgamma direkt és ADRP indirekt célgének növekvő aktivitása), melyet a cadherin-switch is mutat (D: csökkenő E-cadherin és növekvő N-cadherin aktivitás), mRNS expresszió. *Forrás: Kvell et al. PloS ONE. 2010*

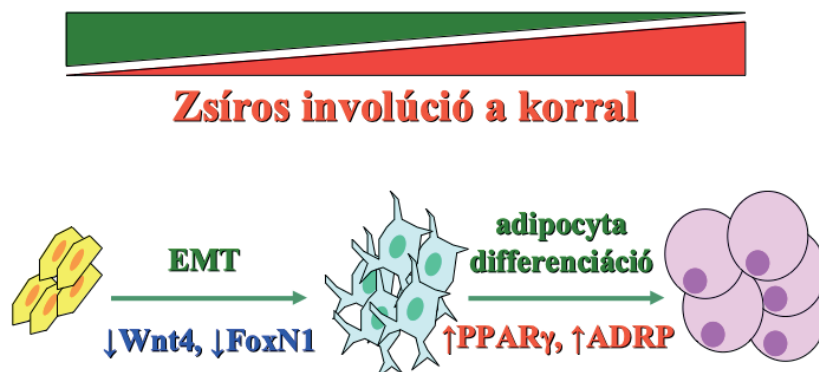
által fenntartott epitél identitás, növekszik a LAP2alpha expressziója, azonban a lamin expressziós szintjétől függetlenül (hiszen a LAP2alpha nem strukturális elem, mint a lamin). Következésképpen növekszik a PPARgamma és ADRP expressziója, valamint átfordul a cadherin-switch (relatív E-cadherin csökkenés és N-cadherin növekedés tapasztalható) (14. ábra).

Az irodalommal összhangban saját kísérleteink szerint a tímusz epitél sejtekben is (TEP1 sejtvonal modellben dolgozva) a LAP2alpha over-expresszió megemeli a PPARgamma szintjét, míg az adott szöveti kontextusban ellentétes hatású Wnt4 csökkenti a PPARgamma szintjét (15. ábra).



**15. ábra:** A LAP2alpha és Wnt4 over-expresszió egymással ellentétes hatást fejt ki a PPARgamma útvonalra tímusz epitél sejtek szöveti kontextusában. **Fenti ábra:** egér TEP1 tímusz epitél sejtek. **Lenti ábra:** egér E12 embrionális tímusz lebenyek (kontroll: 1-e baseline), mRNS expresszió. *Forrás: Kvell et al. PloS ONE. 2010.*

## Epitél identitás csökkenése korrall



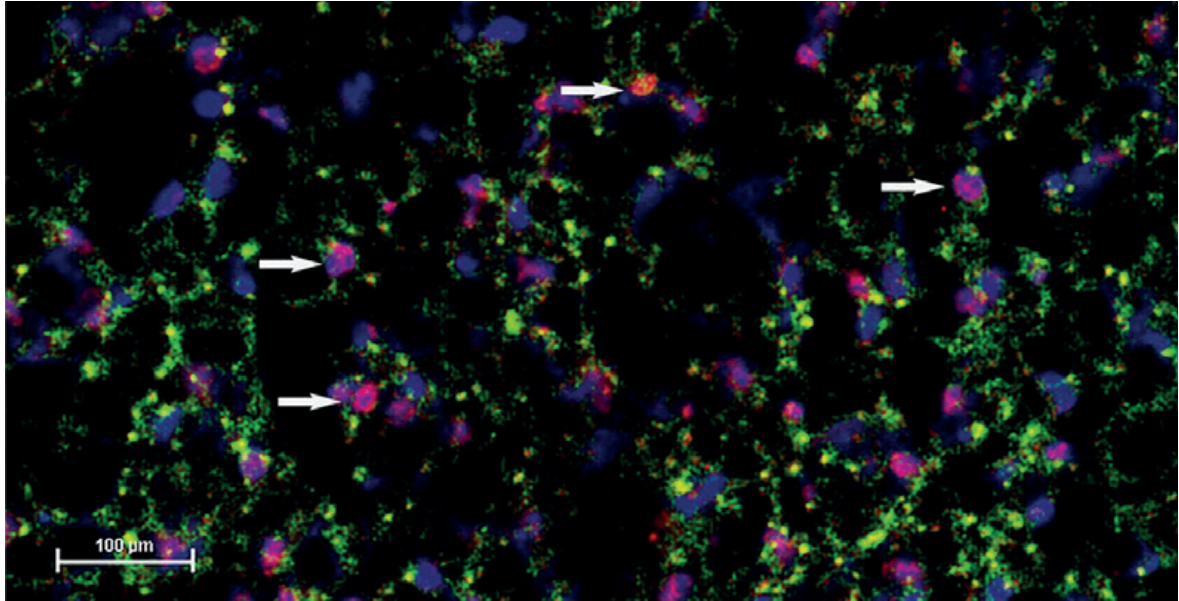
**16. ábra:** A tímusz epitél öregedésének molekuláris szintű modellje. *Forrás: Kvell et al. PloS ONE. 2010.*

A rezidens epitél sejtek a csökkenő Wnt4 jelenlét és a következményesen alacsony FoxN1 expresszió miatt identitásukat veszítik. A növekvő LAP2alpha, PPARgamma és TBX-1 expresszió révén (a TBX-1 szerepe későbbi fejezetben kerül részletesen tárgyalásra) egy köztes fibroblaszt-sejtes állapoton keresztül végül zsírsejt irányban transz-differenciálódnak. Ez az EMT folyamat és a következményes adipocytá expanzió felelős a tímusz öregedése során megfigyelhető zsíros involúcióért, abban sem adipocytá inváziós folyamat, sem egyéb rezidens mesenchymális elem expanziója nem valószínű (**16. ábra**). Molekuláris szintű elméletünk jól illeszkedik az irodalmi konszenzussal, ennek megfelelően rendszeresen idézett, nemzetközileg elfogadott. (145)

## A ZSÍROS INVOLÚCIÓ 'BEIGE' ZSÍRSZÖVETET EREDMÉNYEZ

(közlemény: Bánfai et al. *Front. Endocrinol.* 2019)

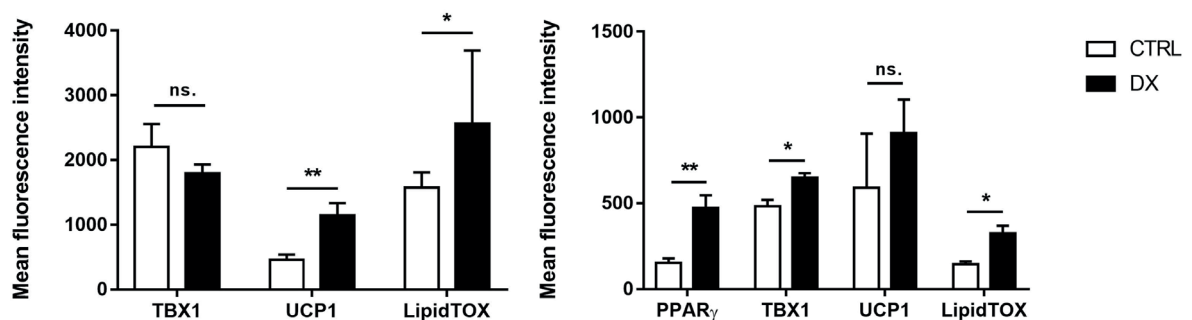
A tímusz helyét az öregedés folyamata során fokozatosan zsírszövet veszi át. A folyamat elképzelhető passzív módon, mely szerint az öregedés során felszabaduló niche helyettesítése zsírszövetel történik, passzív, térkitöltő jelleggel. De felfogható aktív folyamatként is, melyben a tímuszt és környezetét alkotó sejtek és szövetek, főleg a mesenchymális elemek infiltrációja, expanziója, transz-differenciációja aktív módon szorítja ki az identitásukat-vesztett epitél sejteket. (146) Korábban vita tárgyát képezte, hogy a tímusz öregedéssel megjelenő zsírszövet exogén (tímuszon kívüli) vagy endogén (tímuszon belüli) eredetű-e. (147, 148) Endogén eredet esetében is szóba jött meglévő mesenchymális elemek expanziója, illetve egyéb sejtes elemekből történő transz-differenciációja, másodlagos (felnőttkori) EMT folyamata révén. (149-151) Az EMT folyamatát a tímusz kontextusában a PPARgamma aktivitás-fokozódása kíséri. (152, 153) Munkacsoportunk megfigyelései a helyi, aktív, másodlagos EMT folyamat révén történő adipocytá szaporulatot azonosítják a tímusz zsíros involúciójának forrásaként. Van olyan kritikus pillanat a tímusz epitél öregedésének folyamatában, amikor vizualizálható a folyamat (**17. ábra**). A tímusz epitél sejtek még rendelkeznek epitél sejtfelszíni markerrel, azonban magjukban már expresszálják a PPARgamma transzkripciós faktort. Ez az



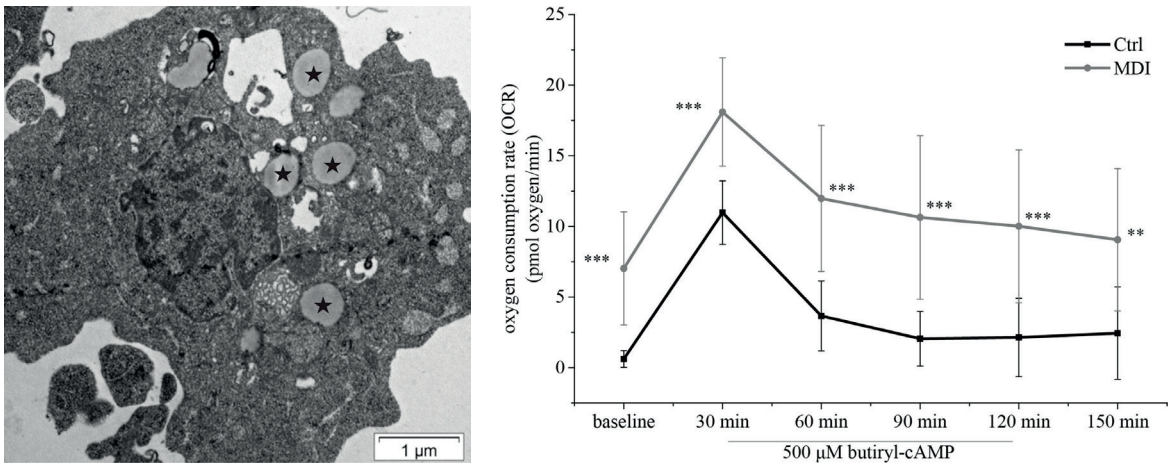
**17. ábra:** A tímusz epitél öregedésének kritikus pillanata (15 hónapos egér tímusz metszet). EpCAM1-FITC, DAPI, PPARgamma-Alexa555 immunfluoreszcens festés. A nyilak ko-lokalizációs festődést mutatnak. *Forrás: Ernszt et al. Front Immunol. 2017.*

áthajlási pont az indirekt epitél-adipocyta transz-differenciációs folyamatban, mely kulcsfontosságú motívum a tímusz öregedésében.

A tímusz helyén megjelenő zsírszövet besorolása sokáig kérdéses maradt a fehér-'beige'-barna zsírszöveti spektrumon az egyéb irodalmi jellemzés ellenére. A helyi intra-thoracalis lokalizáció, a para-sternalis niche és a transz-differenciációs eredet mind a 'beige' zsírszöveti csoport megjelenését valószínűsítik. (154, 155) Nagy biztonsággal csak több molekuláris paraméter (TBX-1, UCP-1, EAR-2, CD-137) együttes vizsgálatával lehet eldönteni, hogy a kérdéses zsírszövet hol helyezkedik el a fehér-'beige'-barna zsírszöveti spektrumon. (156-158) Munkacsoportunknak sikerült ultra-strukturális, molekuláris, sejtszintű és szövet szintű, illetve anyagcsere mintázat alapján a tímusz helyén megjelenő zsírszövetet bona-fide 'beige' zsírszövetként definiálni, mely eredmények közül néhányat bemutatok reprezentatív jelleggel. Gén-expressziós szinten a PPARgamma, TBX-1, UCP-1 expresszió növekedése, illetve sejtszinten a következményes intracelluláris neutrális lipid felhalmozódás (LipidTox festéssel megjelenítve) jelzi a tímusz helyén megjelenő zsírszövet 'beige' zsírszöveti jellegét (**18. ábra**).



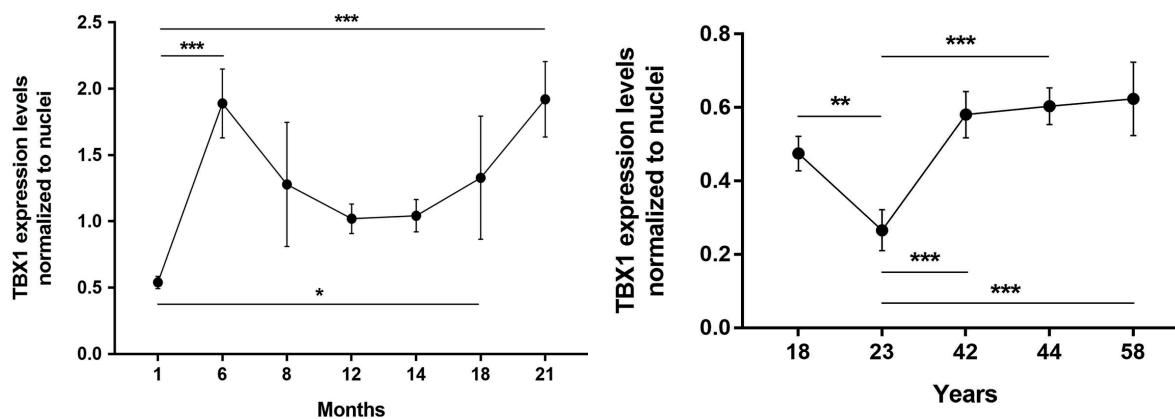
**18. ábra:** Gén-expressziós változások egér (bal, TEP1) és humán (jobb, 1889c) sejtvonal modell esetében. Az *in vitro* öregedési modell triggere az exogén szteroid kezelés (DX: dexametazon). mRNA expresszió. *Forrás: Bánfai et al. Front Endocrinol. 2019.*



19. ábra: Elektronmikroszkópos (bal) és Seahorse (jobb) eredmények TEP1 sejtvonalal. Forrás: Bánfai et al. *Front Endocrinol.* 2019.

A 'beige' zsírszövet és a barna zsírszövet (eltérően a fehér zsírszövettől) egyaránt jellegzetes multi-lokuláris neutrális lipidcsepp felhalmozódást mutat. (159) *In vitro* sejtmmodell eredményeink ezt alátámasztják transzmissziós elektron-mikroszkópiás vizsgálat révén (15. ábra). A fehér-'beige'-barna zsírszövetek jellegzetes, egymástól eltérő metabolikus jellemzőkkel is bírnak. (160) Ezt *in vitro* sejtmmodellben, MDI-differenciációs médium alkalmazását követően az oxigén-fogyasztás mértékével igazoltuk Seahorse-platformon (19. ábra).

Kutatócsoportunk munkája, tudomásunk szerint a világon elsőként, rávilágít a TBX-1 transzkripciós faktor egyedien kettős szerepére a tímusz életciklusa során. A TBX-1 elengedhetetlen a tímusz embrionális organogenezise során, hiányában tímusz aplázia alakul ki, egyéb defektusok mellett. (125-127) Felnőtt korban viszont a tímusz epitél sejtekben újra megjelenő TBX-1 hatására a zsíros involúció jellegzetes 'beige' differenciációs irányt vesz. (156-158) Érdekes módon a tímuszban ugyanaz a transzkripciós faktor meghatározó mind a fejlődés, mind az öregedés során, bár teljesen más fejlődési fázisban, kontextusban és hatással. Ez a jellegzetes, életkor alapján kétszűcsű TBX-1 fehérje expressziós mintázat megjelenik mind egér, mind ember esetében, ha életkorhoz viszonyítjuk az expressziós szintet (20. ábra).



20. ábra: Tímusz metszeteken immunfluoreszcens és immunhisztokémiai módszerrel mért TBX-1 fehérje expresszió kinetika életkor szerint egérben (bal) és emberben (jobb). Forrás: Bánfai et al. *Front Endocrinol.* 2019.



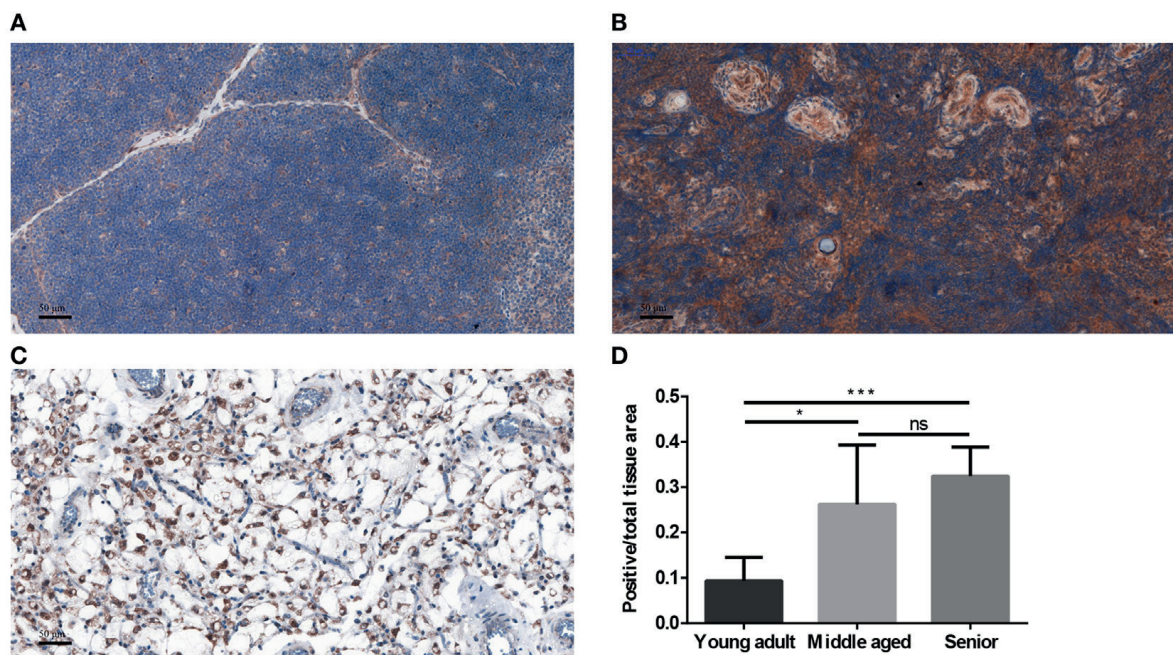
## A ZSÍROS INVOLÚCIÓ SEBESSÉGÉT BEFOLYÁSOLÓ TÉNYEZŐK

(közlemény: Talabér et al. *Rej. Res.* 2011, Solti / Kvell et al. *PloS ONE* 2015, Dulk et al. *Sci. Rep.* 2016, Ernszt et al. *Front. Immunol.* 2017, Boda et al. *Toxins* 2018, Vas et al. *Cells* 2019, Boda et al. *JVAT* 2020)

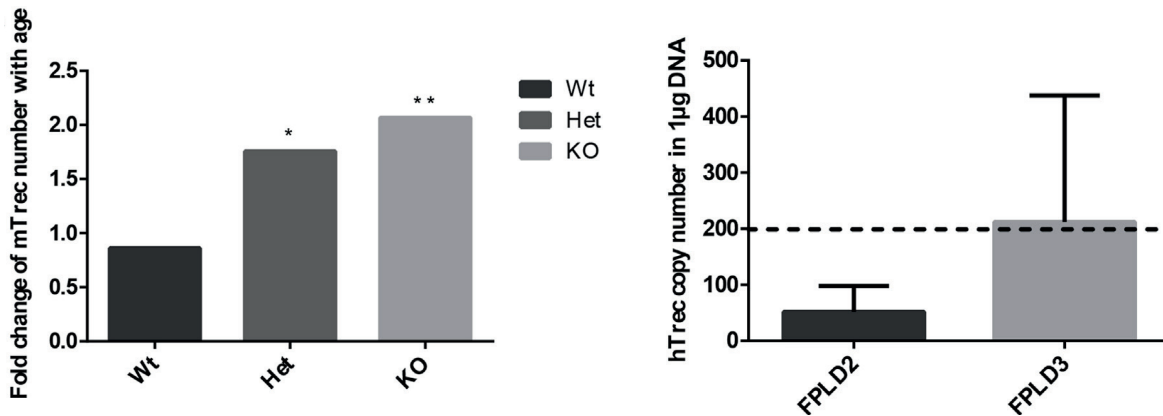
A tímusz öregedésének, zsíros involúciójának sebességét számos tényező befolyásolja, képes azt gyorsítani vagy lassítani, beleértve genetikai (pl. PPARgamma génstátusz), környezeti (pl. szerves és szervetlen toxikus vegyületek) vagy iatrogén (pl. egyes gyógyszerek) behatásokat. (161) Ebben a szövetkörnyezetben is kulcsmolekula a PPARgamma transzkripciós faktor a zsírszövet kialakulása során. (162, 163) Ezt irodalmi adatok mellett saját adataink is alátámasztják (**21. ábra**). A tímusz metszetek korbeli sorozata jól szemlélteti a zsírsejtek megjelenésének kinetikáját.

A fentiek értelmében elvben bármilyen zavar a PPARgamma tengelyben késleltetheti a tímusz zsírszöveti degenerációját, kitolhatja annak funkcionalitását, az életkor ellenére is. Munkacsoportunk bizonyította egér modellben és emberi ritka betegségben egyaránt, hogy a PPARgamma génstátusz közvetlen hatással bír a tímusz öregedésére. Méréseink szerint a PPARgamma génhányos (KO) egérben és PPARgamma domináns-negatív emberekben (FPLD3 alapú lipodisztrófia) elmarad a tímusz funkcionalitásának csökkenése felnőtt korban (**22. ábra**).

A tímusz funkcionalitását megőrző hatás PPARgamma-szelektívnek bizonyul, más genetikai alapú, hasonló fenotípusú ritka betegség esetén (FPLD2 alapú lipodisztrófia) nem mutatható ki ilyen hatás emberben. Kísérleteinkben a fokozott tímusz funkcionalitás mellett (TREC szám) a fokozott immunológiai kompetenciát is teszteltük. Egér modellben dolgozva 1 éves korban teszteltük, hogy a magasabb friss, naív T-sejt termelés (TREC szám) együtt jár-e idős korban is fenntartott orális toleranciával (ovalbumin-teszt), illetve fokozott vakcinációs válaszkészséggel (influenza-teszt), mi-



**21. ábra:** Tímusz metszeteken immunhisztokémiai módszerrel mért PPARgamma fehérje expresszió életkor szerint emberben. *Forrás: Ernszt et al. Front Immunol. 2017.*

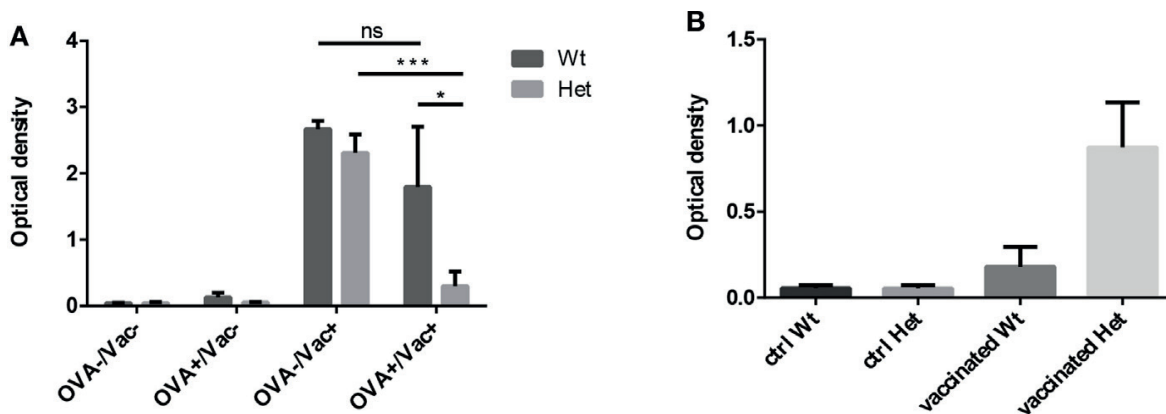


22. **ábra:** Tímusz funkcionalitásának (TREC) mérése PPARgamma génhányos egérben (**bal**, KO törzs) és emberben (**jobb**, spontán génmutáció), középkorú felnőttben mérve. Egér esetében még dózis-hatás is megfigyelhető. *Forrás: Ernszt et al. Front Immunol. 2017.*

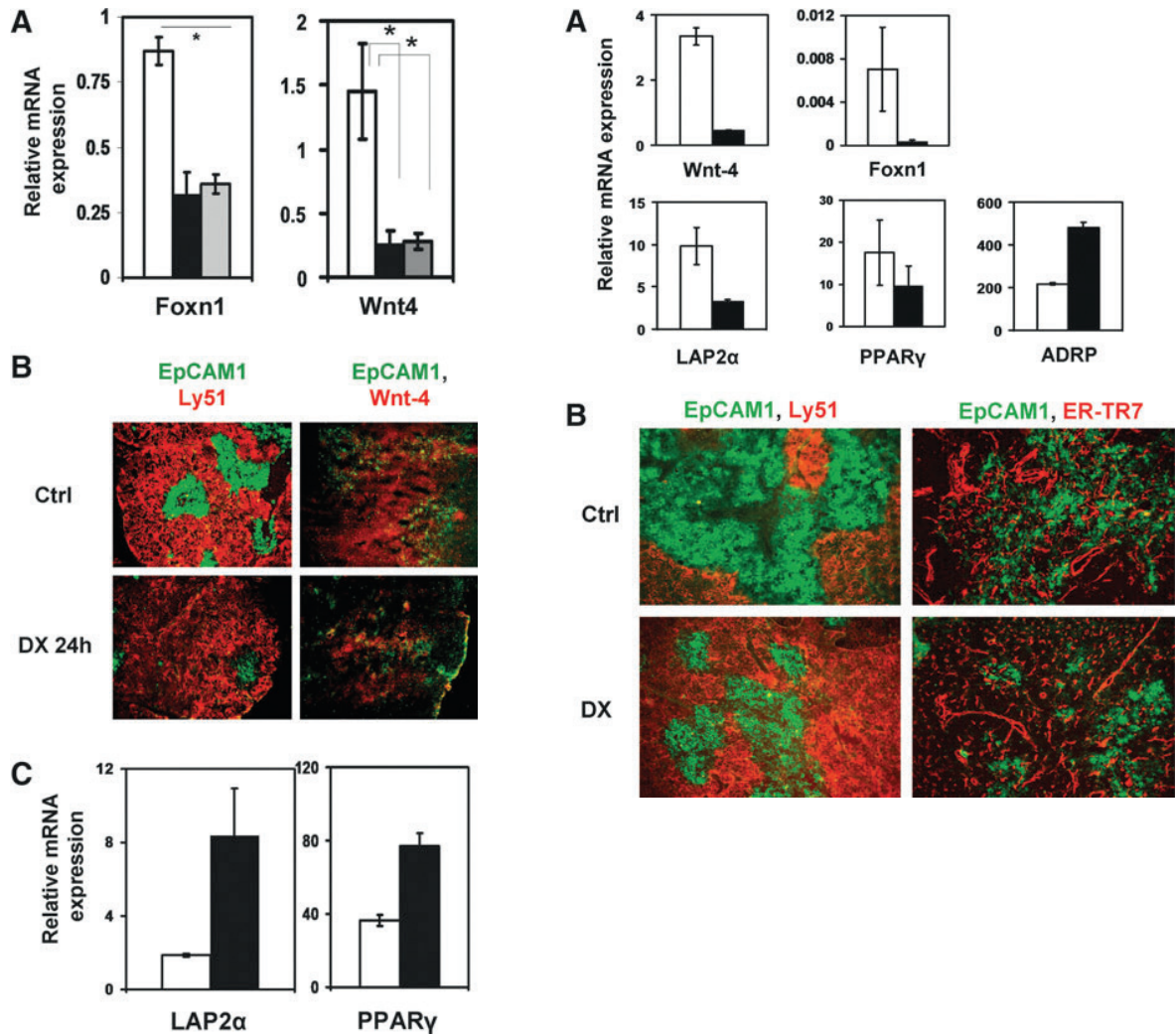
vel az 1 éves kor egérben a tímusz szempontjából már előrehaladott kor. Mind a tolerogén, mind az immunogén teszt fokozott immunológiai kompetenciát igazolt PPARgamma heterozigóta egerekben (a KO egerek nem éltek meg az idős kort, nem tesztelhetők) (23. **ábra**).

A sikereken felbuzdulva kollaborációs partnerünkkel közösen más, a zsírsavanyagcsere és azon belül a 'beige' zsírszöveti sejtek fejlődését minden szinten (molekuláris, sejtes, szöveti, anyagcsere) érintő genetikai hiányállapotban szenvedő egértörzset (TKS4 KO) is megvizsgáltunk felnőtt korban (164, 165) Ezek esetében azonban eddig nem voltak egyértelmű eredményeink a tímusz zsíros degenerációját illetően, így további vizsgálatok szükségesek.

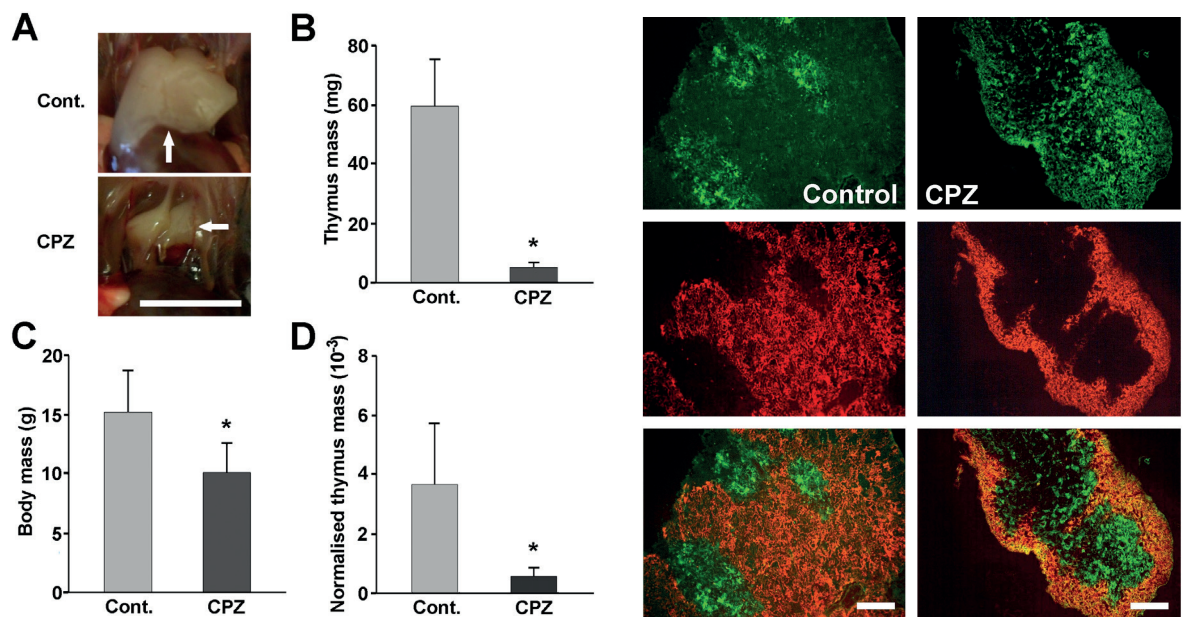
Közismert, hogy szteroid kezelést követően a timociták masszív apoptózist mutatnak, ezzel hozzájárulva a szteroid-kezelés immunszuppresszív hatásához. (166) Szintén ismert a szexuál-szteroidok tímusz epitélre kifejtett progerogén hatása, melyek révén felgyorsul a tímusz zsíros involúciója. (166). Munkacsoportunk egér modellben dolgozva az iatrogén (immunszuppresszív céllal adott) szteroid készítmény (dexametazon) tímusz epitél kompartmentekre kifejtett hatását vizsgálta bólusban (egyszeri 20 mg/ttkg dózis hatása 24 h után), illetve tartósan adagolt (krónikus kezelés 2 mg/ttkg 3 hónap során) felállásban (24. **ábra**). Eredményeink alapján mindkét kezelés jelentős mértékben és tartósan felgyorsítja a tímusz öregedését, vagyis zsíros involúcióját, meglepetésünkre az egyszeri szteroid-kezelés hatása is kimutatható volt még 3 hónap elteltével is.



23. **ábra:** Immunológiai kompetencia mérése egérben 1 éves korban (idős tímusz). Fokozott tolerancia (bal, ovalbumin teszt) és vakcinációs válasz (jobb, influenza teszt) mérhető csökkent PPARgamma funkció esetén. ELISA OD. *Forrás: Ernszt et al. Front Immunol. 2017.*



24. ábra: A szteroid-kezelés (DX) tímusz epitélre kifejtett hatása molekuláris (mRNS expresszió) és szöveti szinten (immunofloreszcens festés) egér modellben, akut kezelés (**bal**, 24 h) és krónikus kezelés után (**jobb**, 3 hónap). *Forrás: Talaber et al. Rejuvenation Res. 2011.*

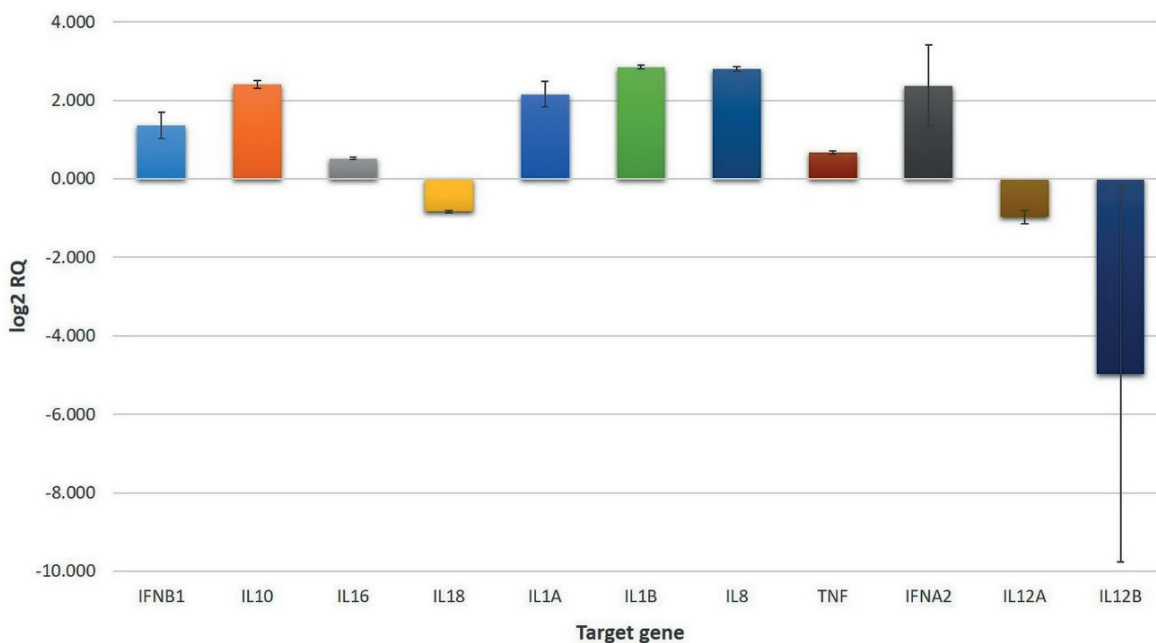


25. ábra: Cuprizon hatására egérben jelentősen csökken a tímusz testarányos mérete (**bal**). A tímusz epitél kompartmentek közül a kortex nagyobb mértékben zsugorodik, mint a medulla (**jobb**), immunofloreszcens festés. *Forrás: Solti/Kvell et al. PloS ONE. 2015.*

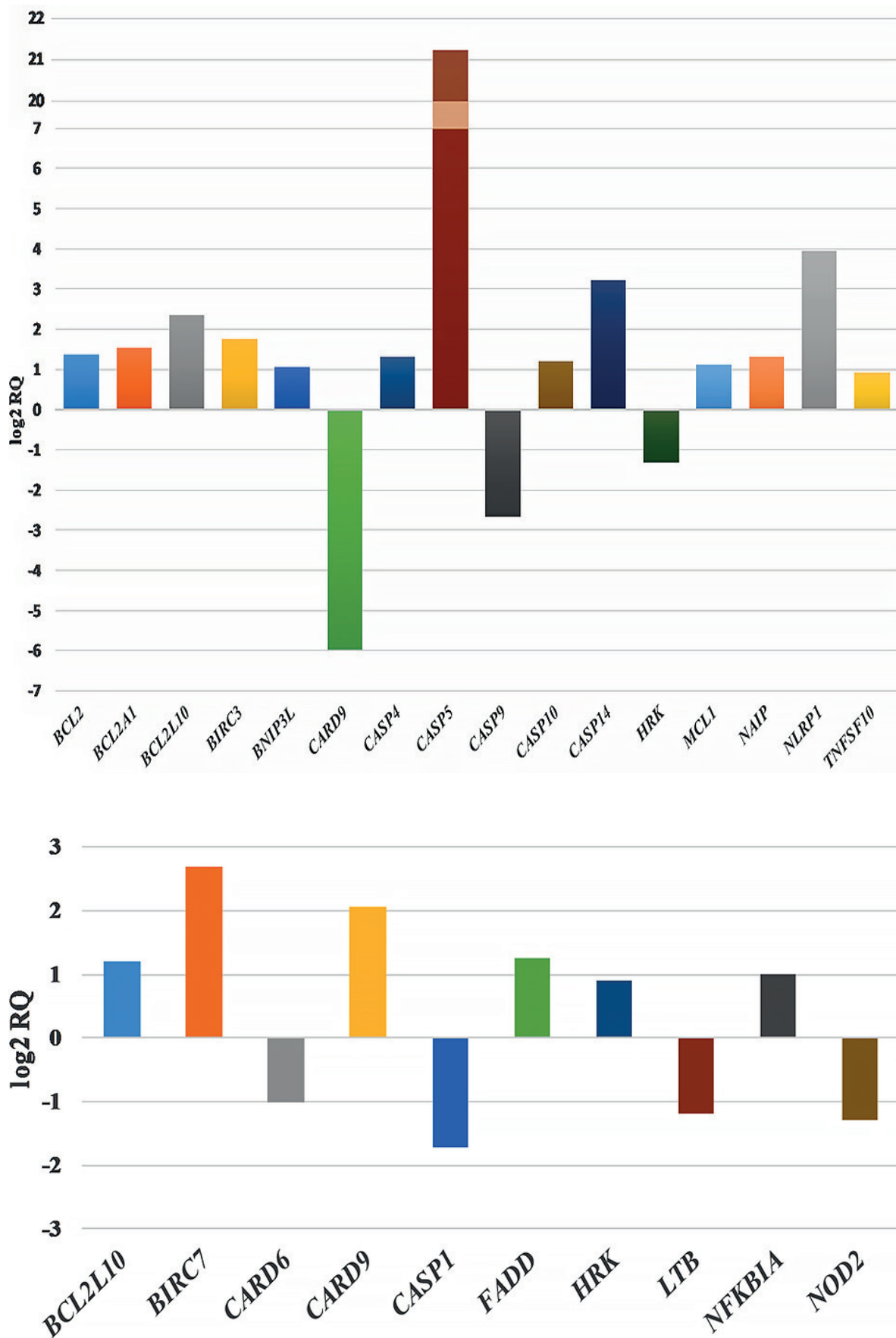
Ezzel ellentétben, szintén munkacsoportunk eredményei alapján, egyes nem biológiai eredetű, de ismerten toxikus vegyületek (pl. a réz-kelátor cuprizon, mely demyelinizációs, sclerosis multiplex egér modellekből ismert) átmeneti jelleggel jelentős mértékben gyorsítják a tímusz epitél és timocita kompartmentjeinek zsugorodását, a tímusz involúciót, ami felhívja a figyelmet a kémiai ágensek potenciális immunológiai progerogén hatására (**25. ábra**). A kezelés hatására a tímusz epitél kompartmentek közül főként a cortex állománya érintett, míg a timocita sejtcsoportok közül a CD4/CD8 kettős pozitív, fokozottan érzékeny, timocita sejtek apoptózisa dominál.

Mesterséges toxikus vegyületek mellett természetes eredetű toxinok is jelentős és tartós károsító hatással lehetnek az immunrendszerre, potenciálisan annak korai öregedését elősegítve. (167-169) Egyes esetekben azonban akár orvosi célra is fordítható hatásuk, ezért kutatásuk új célpontokkal és hatóanyagokkal kecsegtet. (170) Kutatásainkat nemzetközi kollaborációban folytatva és a fókusz tágítva állati toxinok (pl. kígyómérgek) hatását is teszteltük az immunrendszer limfoid (pl. makrofág) és mesenchymális (pl. tímusz epitél) elemein egyaránt. Elsőként humán makrofág sejtvonalat (U937) tettünk ki Vaa (*Vipera ammodytes ammodytes*) toxin hatásának, majd kifejezetten a citokin hálózat jelátviteli útvonalaira kifejtett hatást mértük, molekuláris szinten (**26. ábra**). Eredményeink szerint gyulladáskeltő (TNFalpha), gyulladásgátló (IL-10) és kemokin (IL-8) gén-expressziós változásokat egyaránt kivált emberi makrofágokban a Vaa toxin.

A kígyómérgek irodalmi adatok szerint pro-apoptotikus hatással is rendelkeznek. (171, 172) Mivel a kígyómarás tartós immunológiai károsodást okozhat, munkacsoportunk megvizsgálta két további kígyóméreg (*Bitis gabonica*, Bg toxin és *Dendroaspis angusticeps*, Da toxin) pro-apoptotikus hatását emberi tímusz epitél sejtvonalon. Eredményeink szerint mindkét toxin okoz gén-expressziós változást az apoptózis jelátviteli útvonalaiban. Irodalmi adatok alapján az észlelt eltérések elsősorban a pyroptózisban szerepet játszó útvonalakat érintik, ezen keresztül okozhatnak tartós zavart a tímusz, és így a centrális immunrendszer működésében (**27. ábra**).



**26. ábra:** Vaa toxin hatása U937 emberi makrofág sejteken. Human Cytokine Taqman Array módszer, relatív gén-expressziós változások. Forrás: Boda et al. *Toxins*. 2018.



27. ábra: Bg (fent) és Da (lent) toxin hatása 1889c emberi tímusz epitél sejteken. Human Apoptosis Taqman Array módszer, relatív gén-expressziós változások. Forrás: Boda et al. JVATD. 2020.

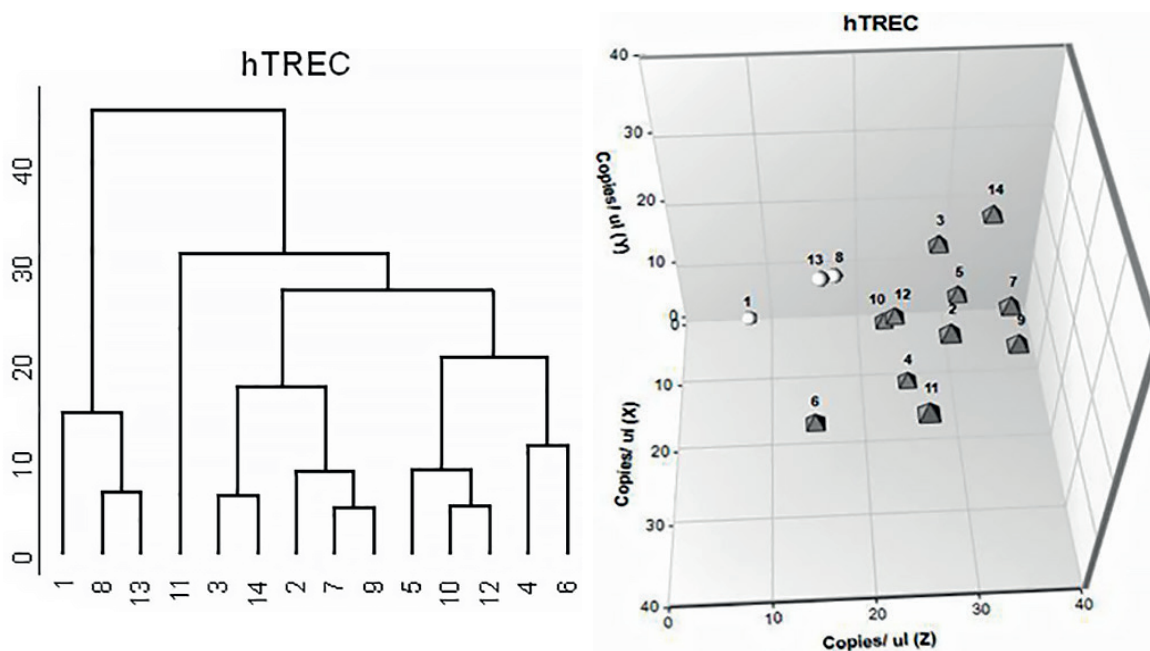
## AZ ÉLETMÓD HATÁSA A TÍMUSZ ÖREGEDÉSÉRE

(közlemény: Garai et al. Front. Physiol. 2019, Garai et al. Front Physiol. 2021)

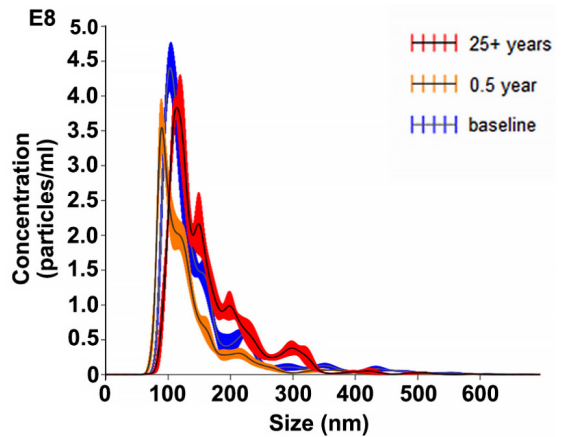
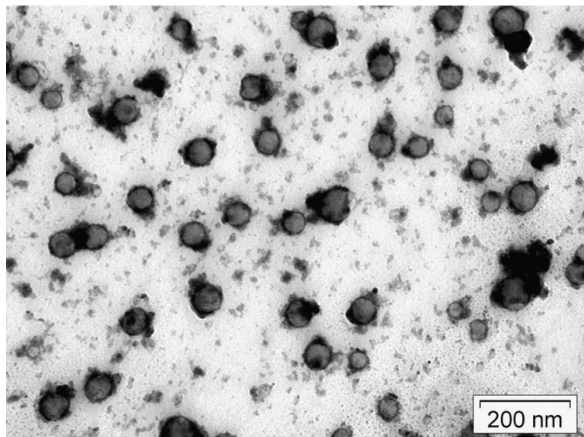
A rendszeres testmozgás krónikus betegségeket (kardiovaszkuláris, metabolikus, malignus stb.) megelőző hatása közismert statisztikai és irodalmi tény. (173-176) A pontos molekuláris mechanizmusok azonban korábban nem voltak kellő mélységben ismertek. Munkacsoportunk fél éven keresztül, személyi edző bevonásával, kontrollált körülmények mellett, korábban rendszeres testmozgást nem végző fiatalok számos anyagcsere, élettani és immunológiai paramétereit vizsgálta. Az általunk vizsgált paraméterek közül a rendszeres testmozgás hatására legnagyobb változást mutató immunológiai paraméter meglepetésünkre a hTREC érték volt, ugyanolyan kulcsparaméternek bizonyult, mint a szérumban inzulin, vagy maga a fizikai aktivitás, kiemelkedve a többi vizsgált sportélettani, metabolikus vagy immunológiai paraméter közül (28. ábra). A kiértékeléshez párban vizsgáltuk az egyes paramétereket és ANN (mesterséges neuronhálózatos adatkiértékelést) használtunk a rejtett mintázatok feltárása érdekében.

Pairwise sensitivity	Actigraph sedentary status	Resting HR	Recovery HR	Systolic BP	Diastolic BP	6 minute WT	relVO2 max	Body Fat%	Muscle Mass%	Glucose	Insulin	HDL	LDL	CRP	Cortisol	Lymphocyte	hTREC	Mean Squared Error	
Actigraph sedentary status		0.1867 **	0.1521	0.0537	0.1682 **	0.0557	0.1938	0.0499	0.0298	0.0688	1.1941	0.1173 *	0.1780	0.0890	0.1629	0.1889 *	0.6352	14E-05	
Resting HR	0.8887 *		0.1308	0.1350	0.1498	0.0766	0.1551	0.0463	0.0272	0.0498	0.9310	0.0661	0.2183 **	0.5281 **	0.1954	0.1503	0.9248 ***	79E-04	
Recovery HR	0.9671 ***	0.0707		0.1371 **	0.1584 *	0.0516	0.1019	0.0434	0.0506	0.0609	0.9269	0.1159	0.2008 *	0.4039	0.2566 ****	0.1641 **	0.7763	98E-02	
Systolic BP	0.7721	0.1860	0.1938		0.1112	0.1044 **	0.2285	0.0796	0.0523 ***	0.0804 **	0.9392	0.1235 **	0.1414 **	0.4314	0.1783	0.0664	0.7733	29E-03	
Diastolic BP	0.6977	0.0970	0.1292	0.1279 *		0.0335	0.2378	0.0634	0.0523 ***	0.0434	0.7955	0.1110	0.1820	0.4629	0.1995	**	0.7576	28E-03	
6 minute WT	0.5466	0.1998 ***	0.1146	0.1243	0.0948		0.2622 **	0.0764 **	0.0338	0.0910 ****	1.4057 *	0.0823	0.2200 **	0.4023	0.2153	0.1908	**	0.4932	30E-04
relVO2 max	0.4450	0.1631	0.0613	0.1227	0.1142	0.1110 ***		0.0741 **	0.0422	0.0716	1.5036 **	0.1119	0.1867	0.6033 ***	0.1963	0.1507	0.6683	75E-03	
Body Fat%	0.7913	0.1634	0.1644	0.0818	0.0854	0.1145 ***	0.1747		0.0426	0.0785 *	1.4830	0.1012	0.1358	0.5569 ***	0.2220 *	0.1666	**	0.5317	37E-04
Muscle Mass%	0.9782 ***	0.1674 *	0.1586	0.1374 **	0.1392	0.1132 ***	0.2896 ****	0.0806 ***		0.0795 *	1.5792 ***	0.1010	0.2085 *	0.3082	0.2502 ****	0.0495	0.8567 *	30E-04	
Glucose	0.8758	0.1972 ***	0.2346	0.1234	0.0268	0.0328	0.2550 *	0.0488	0.0412		1.3613	0.1240 **	0.1550	0.1198	0.1940	0.0179	0.9499	07E-03	
Insulin	0.9311 **	0.1216	0.2375 ***	0.1329 **	0.1623 **	0.0657	0.1671	0.0415	0.0269	0.0630 **		0.1176 *	0.2154 **	0.5036 *	0.2372 **	0.0588	0.9174	30E-03	
HDL	0.9160 **	0.1994 ***	0.2493 ****	0.1191	0.1638 **	0.0563	0.2761 ***	0.0797 ***	0.0417	0.0371	1.4889 **		0.2052 *	0.4111	0.1521	0.1110	0.8015	96E-04	
LDL	0.5738	0.0866	0.0602	0.1201	0.1010	0.1135 ***	0.2967 ****	0.0784 ***	0.0405	0.0696	1.5130 **	0.0999		0.5308 **	0.2416 ***	**	0.6304	53E-04	
CRP	0.7496	0.1563	0.2017	0.0930	0.1306	0.0862	0.2103	0.0644	0.0086	0.0430	0.4625	0.0348	0.0641		0.2159	0.1592	0.7034	81E-04	
Cortisol	0.9376 **	0.0497	0.2403 ***	0.1037	0.1735 ***	0.1126 ***	0.2400	0.0504	0.0161	0.0934 ***	1.5919 ***	0.1207 **	0.1800	0.5337 **		0.1351	0.8097	10E-04	
Lymphocyte	0.9398 **	0.0917	0.2171 **	0.1244	0.1658 **	0.0832	0.1887	0.0684	0.0501 **	0.0727	1.0106	0.0315	0.2260 ***	0.4797	0.1996		0.9448 ***	96E-05	
hTREC	0.7625	0.0971	0.1783	0.1063	0.1673 **	0.0455	0.1690	0.0222 *	0.0366	0.0332	0.7693	0.0962	0.0949	0.1979	0.1423	0.0723		87E-05	
Average	0.7983 ****	0.1366	0.1714	0.1199	0.1296	0.0814	0.2176	0.0645	0.0376	0.0656	1.1644 ****	0.0958	0.1756	0.4316	0.2065	0.1248		0.7693 ****	
SD	0.1631	0.0511	0.0602	0.0226	0.0406	0.0302	0.0540	0.0145	0.0128	0.0191	0.3727	0.0294	0.0468	0.1654	0.0338	0.0596		0.1422	

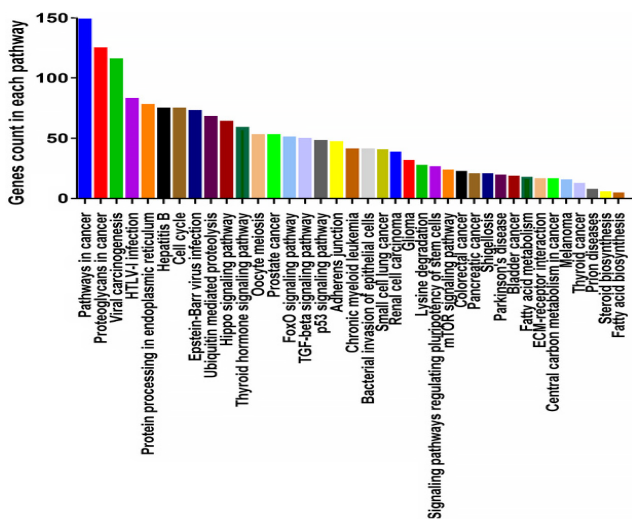
28. ábra: ANN vizsgálat szerint a hTREC ugyanolyan kulcsfontosságú paraméter (lásd színek), mint a szérumban inzulin szint, vagy maga a fizikai aktivitás. Forrás: Garai et al. Front Physiol. 2019.



29. ábra: Egyéni válaszreakció megjelenítése a hTREC paraméter esetében dendrogram (bal) és 3D plot (jobb) segítségével. A hTREC paraméter esetében is azonosíthatók HR és LR egyének. Forrás: Garai et al. Front Physiol. 2019.



30. ábra: Izolált szérum exoszómák elektronmikroszkópos képe (bal, TEM) és morfológiai jellemzése (jobb, Nano-sight). Forrás: Garai et al. Front Physiol. 2021.



31. ábra: Az életmódváltó programban az exoszomális miRNAs fajok által érintett jelátviteli útvonalak csökkenő relevancia sorrendben (bal), a legnagyobb változást mutató miRNAs fajok és az általuk befolyásolt krónikus betegségek (lent). Forrás: Garai et al. Front Physiol 2021.

miRNA species	Affected age-related chronic disease, autoimmune condition or infection	References
hsa-let-7a-5p	Colorectal-, renal-, prostate-, ovarian-, breast-, lung-, pancreas-, gastric-, esophageal-, thyroid cancer, Ewing's and Kaposi's sarcoma, glioblastoma, AML and MML; metastasis formation; cell cycle control; inflammation; diabetes; cardiovascular disease; hepatitis B infection	Iliopoulos et al., 2009; Trang et al., 2010; Lee et al., 2011
hsa-let-7g-5p	Breast-, esophageal-, lung cancer, glioblastoma, AML and CML; graft-vs.-host disease; inflammation; autoimmune thyroid disease; cell cycle control; diabetes; cardiovascular disease; metabolic syndrome; hepatitis B and influenza A infection	Arora et al., 2011; Wang et al., 2013; Biamonte et al., 2019
hsa-miR-130a-3p	Lung-, liver-, prostate-, ovarian-, breast-, cervical-, nasopharyngeal-, prostate cancer, myeloma, CML and glioblastoma; cardiovascular disease; fibrosis; inflammation; autophagy; diabetes; Crohn's disease; hepatitis C infection; cardiac arrhythmia; renal GBM disease; UV damage	Osbourne et al., 2014; Huang et al., 2015; Eichelmann et al., 2018
hsa-miR-142-3p	Liver-, lung-, colorectal-, breast-, cervical-, esophageal cancer, osteosarcoma, prolactinoma, ALL, AML, CLL and MALT lymphoma; graft rejection; Hashimoto's thyroiditis; multiple sclerosis; cardiovascular disease; inflammation; rotavirus infection; Alzheimer's disease; fibrosis	Ma et al., 2016; Sukma Dewi et al., 2017; Wang et al., 2017
hsa-miR-150-5p	Colorectal-, lung-, liver-, prostate-, cervical-, pancreas-, breast-, ovarian-, esophageal cancer, osteosarcoma, glioblastoma, melanoma; Burkitt lymphoma, ALL and MML; inflammation; cardiovascular disease; fibrosis; irritable bowel syndrome; myasthenia; diabetes; SLE; psoriasis	Roderburg et al., 2013; Qu et al., 2014; Yu et al., 2015
hsa-miR-15a-5p	Gastric-, colorectal-, lung-, breast-, liver-, ovarian-, prostate cancer, melanoma, osteosarcoma, neuroblastoma, pheochromocytoma, AML, CLL and multiple myeloma; inflammation; cell cycle control; apoptosis induction; autophagy; multiple sclerosis; hepatitis B infection; fibrosis; diabetes	Xia et al., 2008; Bandi et al., 2009; Sun et al., 2013
hsa-miR-15b-5p	Liver-, gastric-, lung-, liver-, pancreas-, ovarian-, squamous cell cancer, glioblastoma, melanoma, CLL and thymoma; apoptosis induction; metastasis formation; angiogenesis; fibrosis; bipolar disorder; insulin-resistance; skin photoaging; multiple sclerosis; diabetes	Zhang et al., 2015; Li et al., 2016; MacLean et al., 2016
hsa-miR-199a/b-3p	Liver-, gastric-, lung-, renal cell-, ovarian-, pancreas-, colorectal, liver-, breast-, testicular germ cell-, thyroid-, colorectal cancer, endometriosis, glioblastoma, CLL, melanoma, chondrosarcoma and osteosarcoma; osteoarthritis; COPD; autophagy; angiogenesis; HCV infection; inflammation	Li et al., 2015
hsa-miR-223-3p	Ovarian-, gastric-, colorectal-, prostate-, pancreas-, lung-, liver cancer, CLL, AML, ALL, glioblastoma and osteosarcoma; metastasis formation graft rejection; inflammation; osteoarthritis; lipid metabolism; obesity; rheumatoid arthritis; psoriasis; cardiovascular disease; diabetes; COPD; Alzheimer's disease	Wong et al., 2008; Filková et al., 2014; Lunavat et al., 2015
hsa-miR-23a-3p	Gastric-, colorectal-, esophageal-, liver-, renal-, breast-, prostate-, pancreas-, lung-, laryngeal-, lung cancer, CML, AML, Burkitt lymphoma, melanoma, osteosarcoma and endometriosis; retinal degeneration; UV damage; apoptosis induction; autophagy; progeria; osteoarthritis; obesity	Wang et al., 2014; Yang et al., 2014; Zheng et al., 2014
hsa-miR-451a	Lung-, colorectal-, breast-, skin-, bladder-, gastric-, renal-, esophageal-, thyroid-, liver cancer, T-ALL, AML, CML, multiple myeloma, endometriosis, prolactinoma, osteosarcoma and glioblastoma; drug transporters; cell cycle; metastasis formation; angiogenesis; rheumatoid arthritis; cardiomyopathy	Lopotová et al., 2011; Song et al., 2014; Riquelme et al., 2016

A hTREC paraméterben mutatott preventív hatást egyéni válaszkészség szintjén is analizáltuk. Az emberi populáción végzett életmódváltó program diverz, egyénenként különböző hatásmértéket mutat. Más szóval egyéntől függ, ki mely paraméterben profitál a legtovább a rendszeres testmozgásból. Megfordítva, jelentős egyéni különbségek mutathatók ki egyes paraméterekre (pl. hTREC esetében) a válaszkészségben, még akkor is ha kulcsfontosságú paraméterről van szó. Azonosíthatók jól és gyengén válaszreakáló egyének (HR: high responder, LR: low responder), és a populációk szétválása megjeleníthető dendrogram vagy 3D plot segítségével (**29. ábra**). A különböző paraméterekben vizsgálva más és más az egyének eloszlása a HR és LR csoportok megjelenítése esetén, attól függően, ki mely paraméterben profitál.

A tímusz funkcionális állapota meglepően sokat javul a rendszeres testmozgás hatására, objektíven mérhető paraméterek alapján is, még fiatal szervezet esetében is. Ez részben képes magyarázni a rendszeres sport hatására ritkábban előforduló fertőző, daganatos és autoimmun megbetegedéseket, de vélhetően egyéb mechanizmusok is állnak a jelenség mögött. Irodalmi adatok szerint a kis méretű extracelluláris vezikulák, az exoszómák által szállított miRNS molekulák fontos szereplői lehetnek a krónikus betegségek kialakulásában, illetve prevenciójában egyaránt. (177-183) Az életmódváltó programban résztvevő fiatalokból ezért szérumból izoláltunk a program elején, közben és végén, majd komparatív teljes miRNome analízist végeztünk egy amplifikáció-mentes platformot (Nanostring) használva (**30. ábra**).

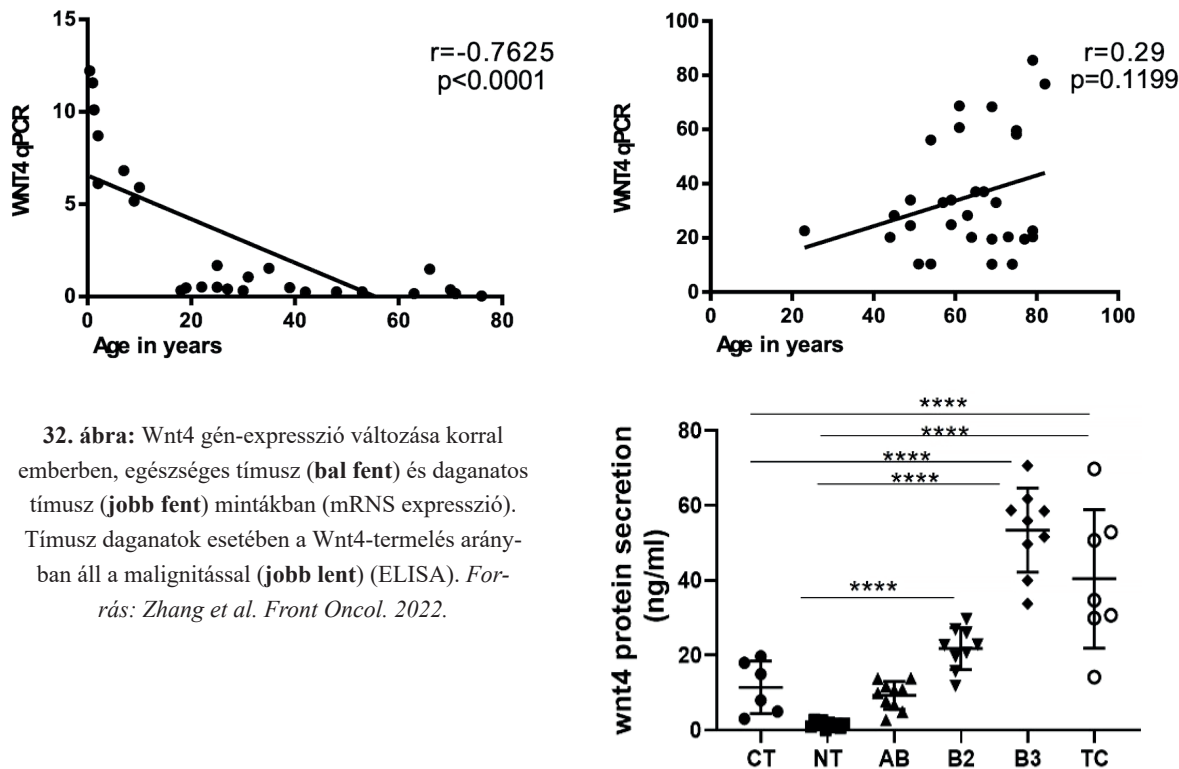
Adatbázisokból dolgozva leszűkítettük a rendszeres testmozgás hatására nagy mértékű expressziós változásokat mutató miRNS-ek csoportját egy tucatra, melyek közösen lefedik a krónikus betegségek többségét (kardiovaszkuláris, metabolikus, malignus stb.) (**31. ábra**). A nagy számú paraméter torzításmentes kiértékelése céljából ezúttal is mesterséges intelligenciás kiértékelést végeztünk, felfedve a valós, preconcepció-mentes mintázatokat.

## WNT4 AUTOKRIN HUOK JELENLÉTE MALIGNUS TÍMUSZ DAGANATOK ESETÉBEN

(közlemény: Zhang et al. *Front. Oncol.* 2022)

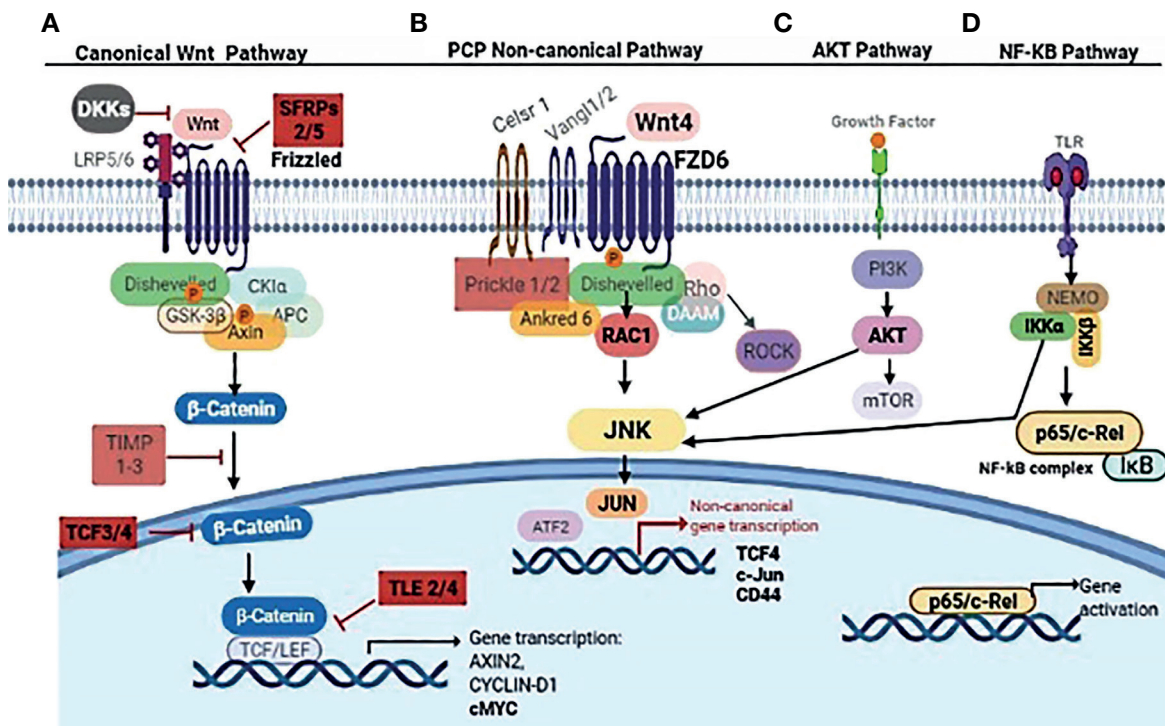
A tímusz epitél állománya esetében is ismert daganatos elfajulás. (184) A daganat a malignitás mértéke alapján ez lehet timóma (benignus) vagy tímusz karcinóma (malignus). (185) Tímusz daganatok esetében is alkalmazható a standard WHO klasszifikáció, bár fontos kiemelni, hogy idővel gyakran spontán fokozódik a daganat malignitása. A benignus daganatok rendszerint támogatják a tímusz fő funkcióját (friss naiv T-sejt képzés), bár ezt a feladatot tökéletlenül végzik, ami autoimmun folyamatokhoz vezethet. (186) Munkacsoportunk nemzetközi kollaborációban dolgozva megvizsgálta humán tímusz epitél daganatok esetében is a Wnt4 molekuláris tengely aktivitását. A kapott eredmények egyrészt egybevágóak saját korábbi eredményeinkkel, mely szerint az életkorral csökken a tímusz epitél Wnt4 termelése (**32. ábra**). Azonban az is megfigyelhető, hogy a kor előrehaladtával, ha jelen van tímusz daganat, az általa termelt Wnt4 mennyisége fokozott (**32. ábra**). Ez összecseng irodalmi adatokkal, melyek a korrallal fokozódó SNP előfordulást és proliferációs (malignitási) haj-





lamot írnak le. (187) A daganatok által termelt Wnt4 aktivitása megőrzött és képes a tímusz epitél sejtek proliferációját fokozni. (188)

A kollaborációban kapott eredményeink szerint a Wnt4 jelátviteli útvonalat a tímusz daganatsejtek autokrin módon alkalmazzák saját osztódásuk fenntartására, méghozzá a malignitással arányosan fokozódó mértékben (33. ábra). Érdekes módon a Fz6 receptort részesítik előnyben a daganatsejtek



33. ábra: A malignus tímusz epitél daganatsejtek autokrin Wnt4 hurok segítségével tartják fenn proliferációs készségüket. Forrás: Zhang et al. Front Oncol. 2022.

is a Wnt4 jelátvitel autokrin felhasználása során, ahogy az öregedés során ezt korábban munkacsoportunk is leírta normál tímusz epitél sejtekben (**8. ábra**).

Ezek az eredmények felhívják a figyelmet arra, hogy még a tímusz szövetére szelektíven kifejlesztett hatás esetében is csak megfelelő körülményekkel szabad megerősíteni lokálisan a Wnt4 hatást, nehogy egy lappangó daganatos elváltozás malignitását kedvezőtlenül befolyásolja a tímusz regenerációra tett törekvésünk, s a mérsékelt rizikójú tímusz progériát egy fokozott rizikójú daganatos betegség váltsa fel. Ezen kívül a tímuszban fejlődő timociták is Wnt4-et termelnek, melyért cserébe optimális fejlődési környezetet biztosít számukra a tímusz epitél hálózata, ezért az erős egymásra utaltság epitél és timocita sejtek esetében erősen megnehezíti a Wnt4 útvonalon szelektíven az epitélsejtes daganatokra ható potenciális terápiás kezelés kidolgozását.

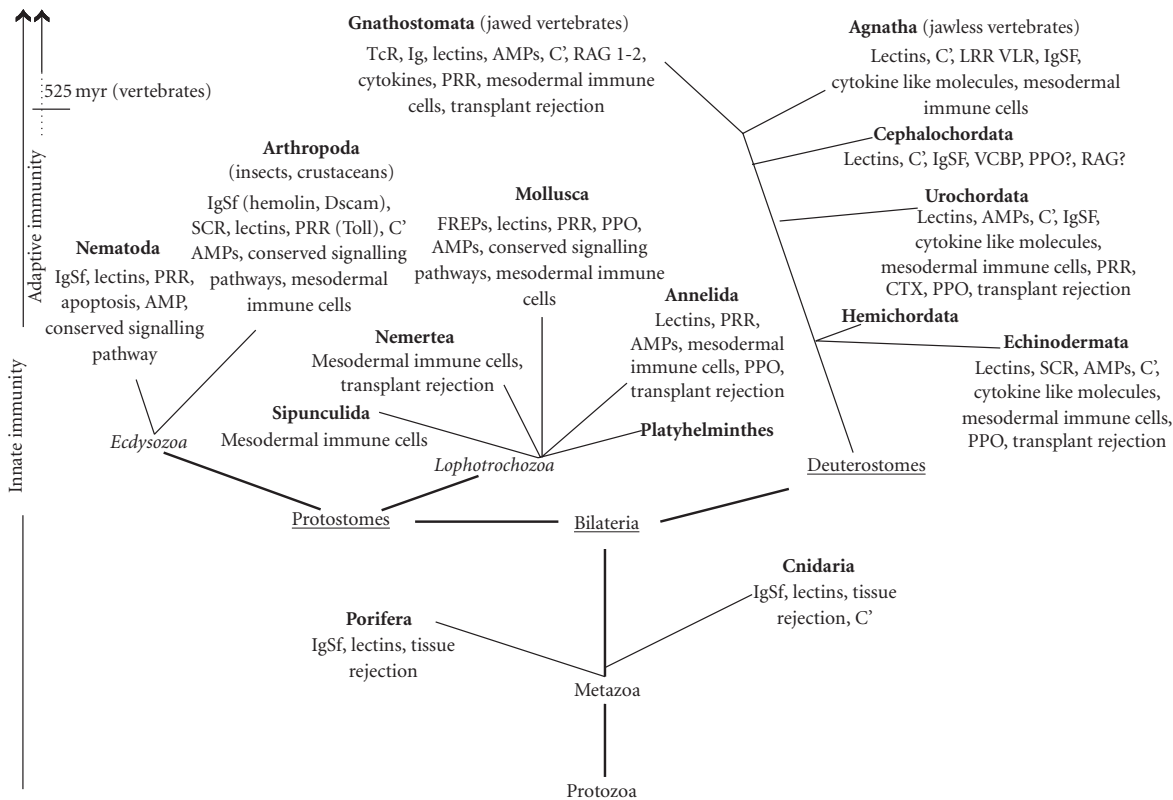
## A PPAR $\gamma$ ÚTVONAL HATÁSA A SZÖVETKÖRNYEZET FÜGGVÉNYÉBEN

(közlemény: Kvell et al. *Clin Dev Immunol.* 2007, Farkas et al. *Clin Orthop Relat Res.* 2010, Bartis et al. *PloS ONE* 2013, Kovács et al. *Aging Cell* 2014, Rapp et al. *Resp Res.* 2017)

A PPAR jelátviteli útvonalak három transzkripciós faktor vezérlését foglalják magukban: a PPAR $\alpha$ , a PPAR $\beta/\delta$  és a PPAR $\gamma$ . (189) Közülük a PPAR $\gamma$  a legsokoldalúbb. Szerepe a zsírsanyagcserével kapcsolatban közismert, lényegében minden zsírszövet (fehér, barna, 'beige') kifejlődéséhez szükséges. (190) Azonban a közismert adipogén anyagcsere folyamatok mellett a PPAR $\gamma$  nagyon erős befolyással bír számos egyéb folyamatban és betegségben is, egyebek mellett neuro-degeneratív és gyulladásos betegségekben, különböző immunpatológiákban. (189) A PPAR jelátvitel evolúciósan ősi és konzervált. Munkacsoportunk kollaborációban részt vett korai és fejlett immunrendszerek komparatív összehasonlításában, szintén evolúciósan ősi és konzervált elemek nyomait kutatva (**34. ábra**).

Friss kutatások alapján a PPAR családról ismertté vált, hogy már gerinctelenekben is (*C. Elegans* modellben) betegség-megelőző szerepe van számos, az immunrendszer működésével összefüggő betegségben. Ide tartozik pl. bakteriális fertőzés: *S. Aureus* fertőzés esetén a PPAR $\alpha$  expresszió segíti a fertőzés leküzdését. (191) Egy másik betegség esetén, melyben szintén fontos az immunválasz mértéke és jellege: gerinctelen Alzheimer modellben a PPAR $\gamma$  aktivitása révén enyhébb lehet a betegség lefolyása a fokozott AB plak- lebontás következtében (**35. ábra**). (192, 193) Munkacsoportunk tímusszal kapcsolatos kutatási eredményei alapján a PPAR, és azon belül a PPAR $\gamma$  aktivitás csökkentése kívánatos lehet a korrallal megjelenő zsíros degeneratív involúció kivédése érdekében. Azonban a PPAR jelátviteli útvonalak szisztémás, több szövetkörnyezetre kiterjedő gátlása (a nyilvánvaló adipogén anyagcsere problémák mellett) számos egyéb okból is káros lehet, melyre ezek a gerinctelen modellek is rávilágítanak.

Munkacsoportunk olyan, az idős korban jellemző degeneratív gyulladásos betegséget is vizsgált emberben (osteoarthritis), melynek lefolyásában szintén fontos szereppel bír a PPAR család aktivitása. Ebben a szövetkörnyezetben irodalmi adatok szerint a veleszületett immunrendszer gyulladásban

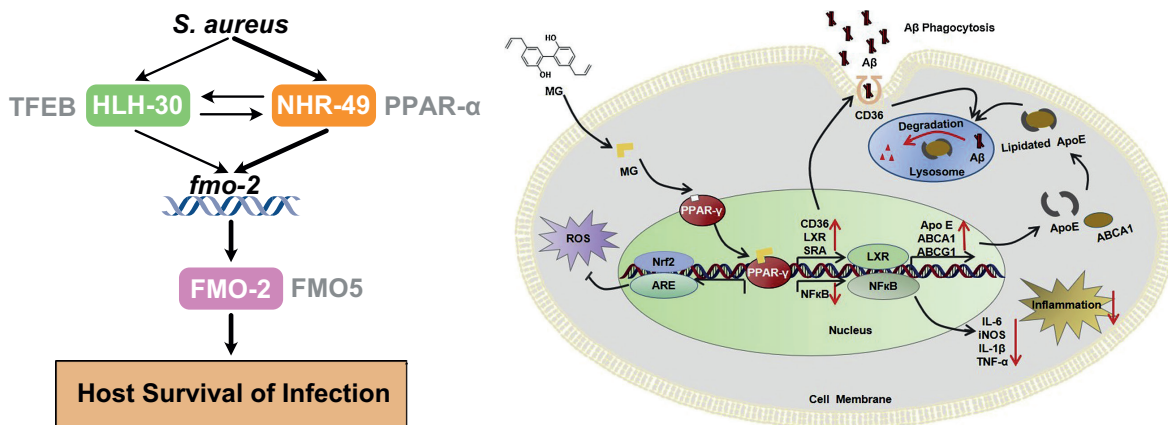


AMP: antimicrobial peptides  
 C': complement pathway elements  
 CTX: cortical thymocytemarker in *Xenopus*  
 Dscam: drosophila homolog for Down syndrome cell adhesion molecule  
 FREPs: fibrinogen related peptides  
 IgSf: immunoglobulin superfamily

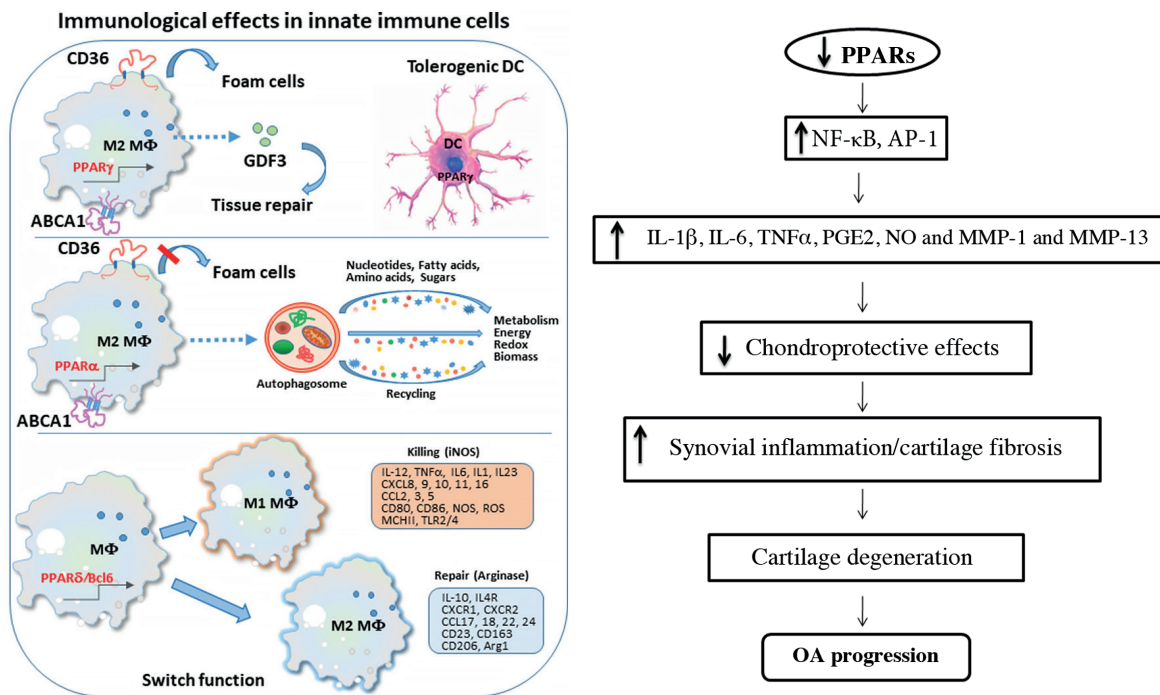
LRR VLR: variable lymphocyte receptors with leucine rich repeats  
 PPO: prophenoloxidase cascade  
 PRR: pattern recognition receptors  
 RAG: recombination-activating genes  
 SCR: scavenger receptors  
 VCBP: variable chitin binding proteins  
 TCR: T cell receptor

34. ábra: Gerinctelen és gerinces immunrendszer komparatív összehasonlítása korai immunológiai elemek evolúciós nyomait kutatva. Forrás: Kvell et al. Clin Dev Immunol. 2007.

fontos sejtes elemei (makrofágok és dendritikus sejtek) differenciálódását és funkcióját egyaránt befolyásolja a PPARgamma. (194) Ezen túlmenően a PPAR fokozott expressziója porcsejt-védő hatást is képvisel, illetve gátolja a másodlagos sebgyógyulást (fibrózist / hegesedést) a csont/porc határon,



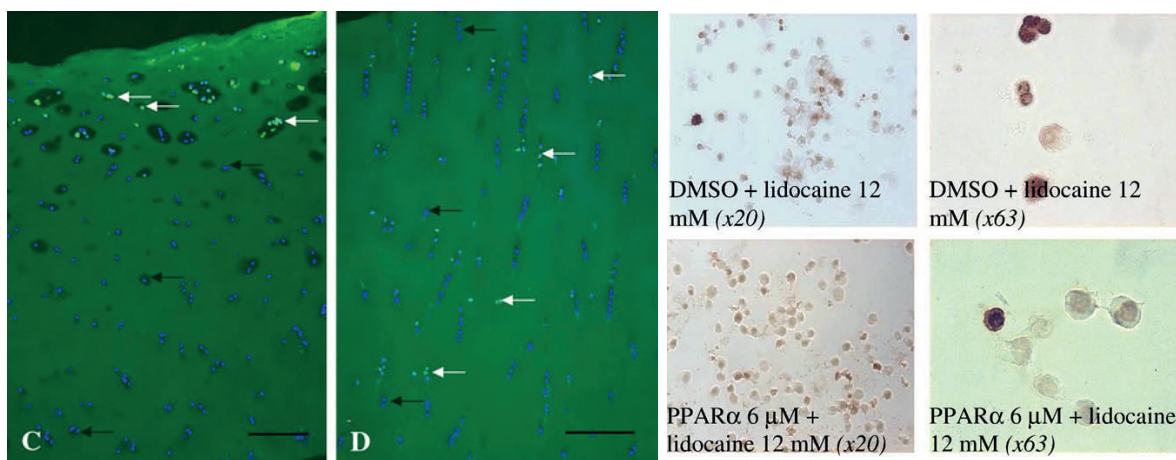
35. ábra: C. Elegans modellben a PPARalpha S. Auerus fertőzést-megelőző hatással rendelkezik (bal), míg a PPARgamma Alzheimer-megelőző hatással bír (jobb). Irodalmi források: Wani et al. Elife 2021, Xie et al. Biomed Pharmacother 2020.



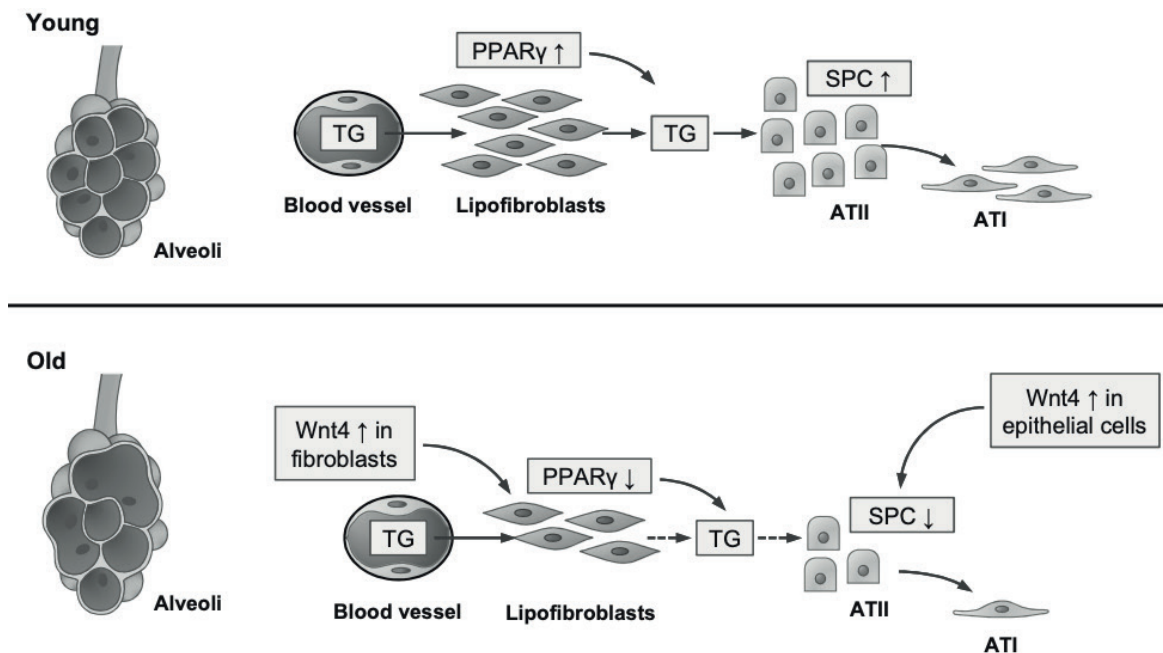
36. ábra: A PPARgamma befolyásolja a makrofágok működését és differenciációját (bal), valamint az osteoarthritis (OA) lefolyását (jobb). Irodalmi források: Christofides et al. *Metabolism*. 2021, Huang et al. *Mol Med Rep*. 2021.

irodalmi adatok szerint (36. ábra). (195) Gátlása tehát ebben a szövetkörnyezetben káros lenne idős korban, emberi kutatási eredmények alapján is.

Munkacsoportunk részletesen vizsgálta az osteoarthritis kezelésére lokálisan gyakran adott lidocain-csoportba és szteroid-csoportba tartozó gyógyszerek által a porcsejtek apoptózisára és nekrozisára kifejtett hatást külön és kombinációban is. Bár ezen hatóanyagok alkalmazása kifejti az áhított tünetenyhítő hatást, sajnos a porcsejtek megsínylik a kezelést, közülük több is a diffúziós határig apoptózist, vagy akár nekrozist szenved, ezért ezen szerek kombinált alkalmazása a kedvező rövid távú klinikai hatás ellenére is ellenjavallt a hosszú távon valószínű mellékhatások miatt (37. ábra). Irodalmi adatok szerint a lidocain-csoport által okozott apoptózist azonban képes ellensúlyozni a



37. ábra: Szteroid által önmagában (C) és lidocainnal együtt (D) okozott porcsejt apoptózist humán porcşövet tenyésztetben (bal), lidocain által indukált apoptózis humán makrofágokban PPARalpha agonista jelenlétében (jobb). Fluoreszcens (bal) és hisztokémiai (jobb) TUNEL assay. Forrás: Farkas et al. *Clin Orthop Relat Res*. 2010. Irodalmi forrás: Billet et al. *J Mol Biol*. 2008.

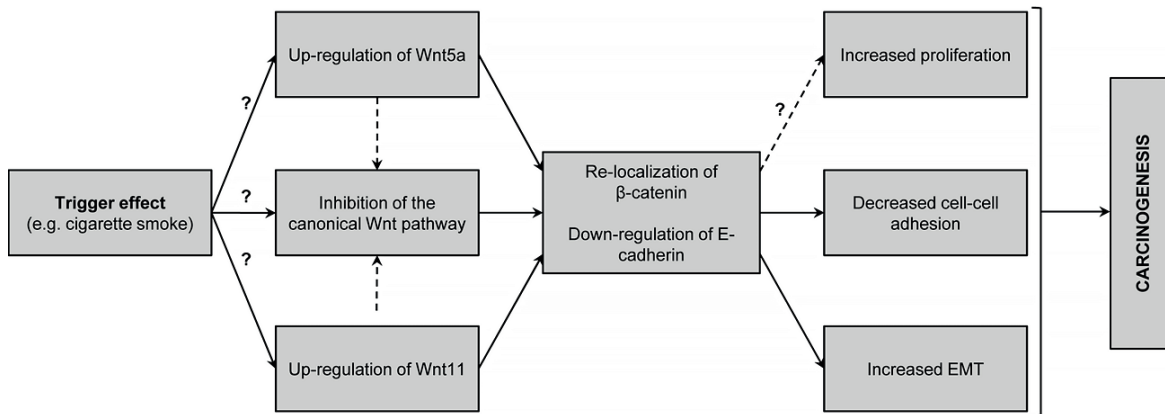


**38. ábra:** Fialat korban a tüdőben (fent) erős a PPAR $\gamma$  aktivitás és az ATII-es epitél összegek pótolják az SPC fehérjét termelő differenciált ATI-es epitél sejteket. Idős korban (lent) a fokozott Wnt4 és csökkent PPAR $\gamma$  aktivitás következtében renyhe a szöveti regeneráció és az SPC termelődése. *Forrás: Kovacs et al. Aging Cell. 2014.*

PPAR $\alpha$  expresszió, kifejtve sejtvédő hatását. (196) Irodalom szerint a humán monocitákból PMA-indukcióval létrehozott makrofágokban a lidocain által indukált apoptózist a PPAR $\alpha$  szelektív agonista (GW647) potensen megakadályozza (**37. ábra**).

Munkacsoportunk további szövetekben is végzett kutatást a Wnt és PPAR molekulacsalád időskori degeneratív folyamatokban játszott szerepét illetően. A PPAR aktivitás fennmaradása nem csak az ízületben fontos a gyulladásos vagy apoptotikus folyamat elkerülése céljából. Hasonlóan fontos a PPAR $\gamma$  aktivitás fennmaradása az öregedés során a tüdőszövet esetében is, irodalmi adatok és saját munkacsoportunk eredményei alapján egyaránt. (197, 198) A tüdő esetében az öregedés során a tímusz szövetében tapasztaltnal ellentétes irányú molekuláris szintű változások zajlanak le. A kor előrehaladtával növekszik a lipofibroblaszt és epitél sejtek által termelt Wnt4 mennyisége, ami itt is gátolja a PPAR $\gamma$  aktivitást. Azonban ebben a szöveti környezetben a PPAR $\gamma$  aktivitásának csökkenése kedvezőtlen hatású, gátolja az ATII-es szöveti összegek ATI-es típusú differenciált sejtekké történő átalakulását. Ez gátolja az idős korban fokozottan szükséges szöveti regenerációt és a felületi feszültséget csökkentő SPC termelését, vagyis többszörösen is gyorsítja az öregedést. Éppen ezért, a tüdő esetében a tímusszal ellentétes molekuláris szintű folyamat (vagyis a Wnt4 expresszió visszaszorítása) szükséges a szöveti regeneratív folyamatok támogatása érdekében, illetve a porcsejtek és makrofágok szövetkörnyezetében tapasztaltakhoz hasonlóan a PPAR aktivitásának megőrzése a cél (**38. ábra**).

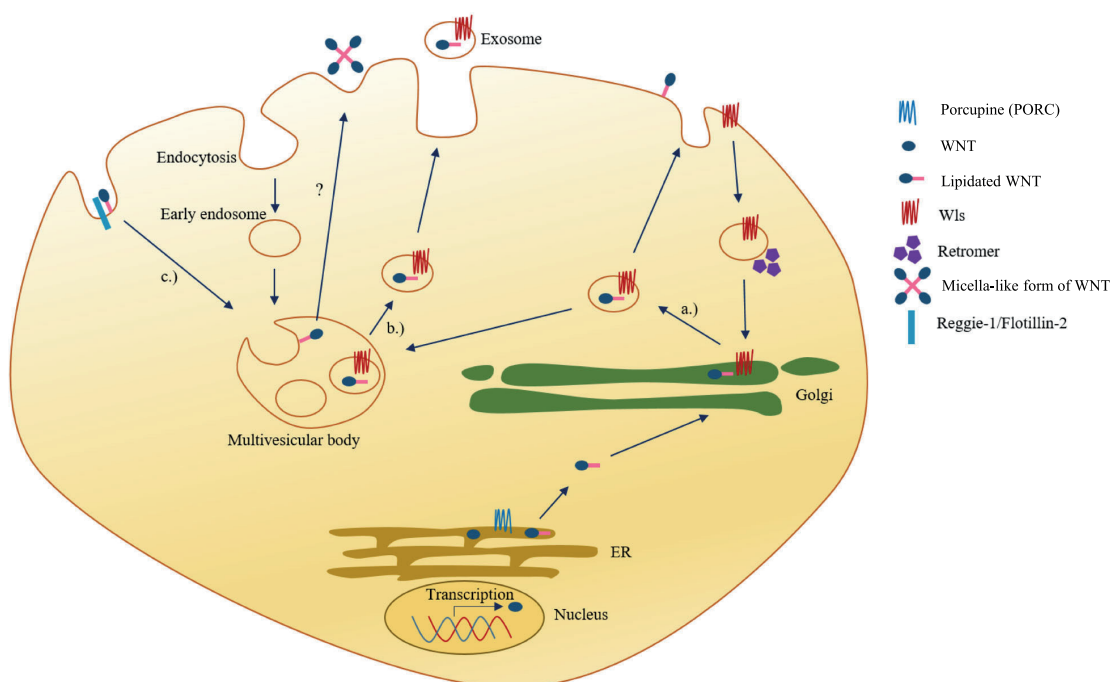
A Wnt jelátvitel az egészséges és patológiás állapotok rendkívül széles palettáját befolyásolja, kezdve az embrionális fejlődéssel majd folytatva a szöveti differenciálódással, de ide tartozik számos betegség, így a daganatos betegségek kialakulása is. Kiterjedt irodalommal rendelkezik a Wnt jelátvitel torzulása, rövidre zárása (autokrin loop) számos daganatos betegségben. (199-201) Munkacsoportunk kollaboratív munkában a Wnt4 példáján keresztül ezt bemutatta a tímusz-daganatok



**39. ábra:** Krónikus gyulladáskeltő inger hatására (dohányzás) a kanonikus Wnt jelátvitel gátlása és daganatos elfajulás alakulhat ki emberi tüdő epitél sejtekben. *Forrás: Bartis et al. PloS ONE. 2013.*

(timómák és tímusz karcinómák) esetében (lásd **29. ábra** korábban). Munkacsoportunk azonban más daganatok, a tüdődaganatok esetében is számos kutatási eredménnyel rendelkezik. A dohányzás-indukálta krónikus gyulladás tüdődaganatok kialakulásához vezethet emberben. A tüdődaganat típusától, genetikai háttérétől függően adenokarcinóma (AC) esetében a Wnt11, míg laphámsejtes karcinóma (SCC) esetében a Wnt5a over-expresszió a jellemző a ligandok szintjén, míg a Fzd3 (AC) és Fzd11 (SCC) a receptorok tekintetében, illetve a DKK1 gátló fehérje mindkét típusban emelkedett. Ezek fokozzák a sejt-proliferációt, csökkentik az adhéziót és differenciáltságot, melyek eredője a daganatos elfajulás és áttétképződés lesz (**39. ábra**)

A Wnt ligandok kémiai összetételüket tekintve glikolipoproteinek. A Wnt ligandok irodalmi források szerint gyakran szállítódnak kis méretű extracelluláris vezikulákban, vagyis exoszómákban. (202, 203) Ezt munkacsoportunk eredményei is megerősítik, a tüdő epitél sejtei Wnt ligandokat



**40. ábra:** Egészséges és daganatos tüdő epitél sejtek is termelnek exoszómákat, melyek – egyebek mellett – Wnt ligandokat képesek védett és szelektív módon célba juttatni, vagy autokrin loop mechanizmussal visszacsatolást biztosítani.

*Forrás: Rapp et al. Resp Res. 2017.*

tartalmazó exoszómákat bocsátanak ki, mely egyrészt lehetővé teszi a szelektív célbajuttatást, másrészt védi a Wnt ligandokat (**40. ábra**). A természetes exoszómák és mesterséges nanopartikulák nagy érdeklődésre tartanak számot és komoly alkalmazott biotechnológiai potenciállal rendelkeznek, melynek kifejtése a következő fejezetben kerül tárgyalásra.

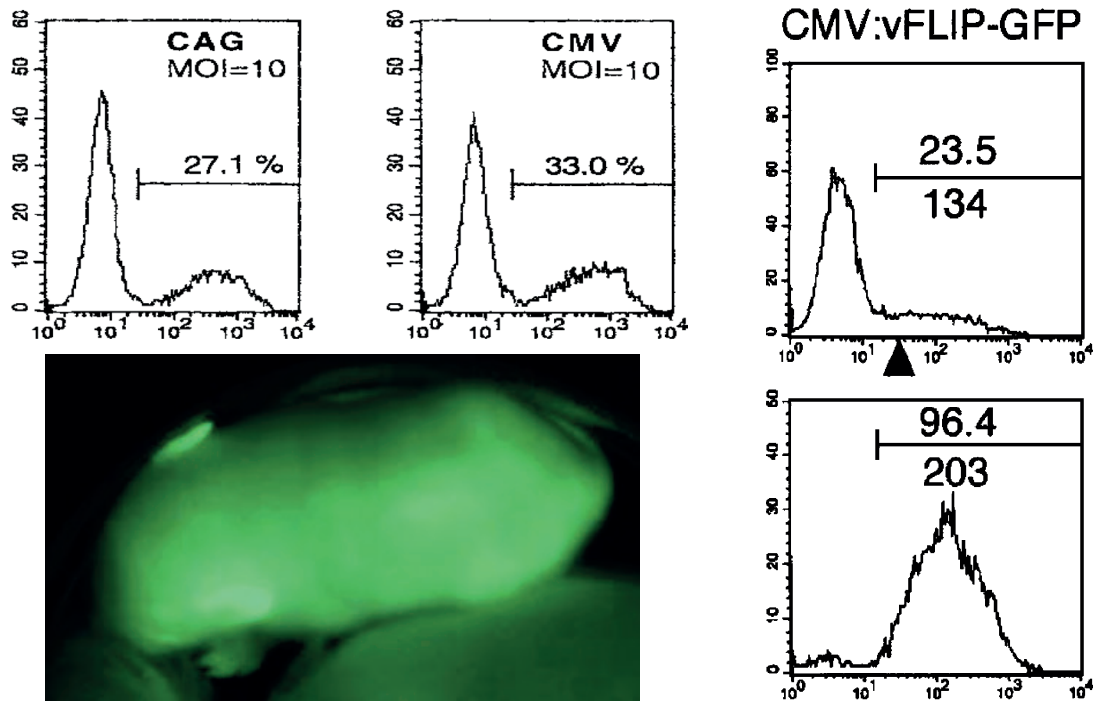
## SZÖVETI SZELEKTIVITÁS ELÉRÉSE GM VEZIKULÁK, SZILIKA NANO-GYÖNGY, LNP HASZNÁLATA RÉVÉN

(közlemény: Bovia et al. *Blood* 2003, Kvell et al. *Mol Ther.* 2005, Kvell et al. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006, Kvell et al. *Transgenic Res.* 2010, Szabo et al. *Int Immunol.* 2012, Bánfai et al. *Front. Immunol.* 2019)

A korábbi fejezetek alapján a tímusz epitél esetében a csökkenő Wnt4 ligand szintje az a molekuláris kulcsmotívum, amely a zsíros degeneráció folyamatát elindítja az öregedés során a csökkenő FoxN1 transzkripciós faktor szint és a meginduló EMT majd adipocita transz-differenciáció révén. A tímusz szövet esetében így kívánatos idős korban is a Wnt4 ligand fokozott jelenlétének elérése. A Wnt4 ligand jelenlétének fokozott szintje más szövetek esetében azonban nem kívánatos, hiszen eredményeink szerint a tüdőben fokozná a PPAR család gátlása révén az öregedés ütemét, illetve az ízületben súlyosbítaná az idős korban gyakori gyulladáshoz vezető porckopás (osteoarthritis) lefolyását. Vagyis a tímusz szövetre specifikus, célzott Wnt4 ligand jelenlét és hatás a célunk, nem pedig szisztémás hatás. A célzott, szelektív szöveti célba juttatás tímusz esetében kihívást jelent. Nagy valószínűséggel genetikai módosítást (GM) szükséges végrehajtani a sikeres tímusz-szövetre szelektív célba juttatás érdekében.

A genetikai módosítások módszertanának repertoárja kiterjedt. (204-206) A költséghatékonyan reprodukálható eredmények érdekében gyakran stabil genetikai módosításra van szükség, melynek egyik bevett módszere a lentivirális (HIV-1 alapú) génbevitel. A lentivirális vektorok könnyen és biztonságosan előállítható mesterséges vírusok, melyek révén létrehozhatók stabilan génmódosított sejtek és élőlények. Munkacsoportunk jelentős módszertani jártassággal rendelkezik a lentivirális génbevitel technikáját illetően (**41. ábra**). A módszerrel sikeresen integrálhatók marker gének (pl. GFP), de akár funkcionális fehérjék is, legyen az sejtfelszíni, citoplazmatikus vagy magban exprezezt (pl. FLIP, MARCO, ZAP70 stb). (207-208) A lentivirális génbevitel stabil és alacsony kópiaszámú integrálódásának köszönhetően Mendeli öröklődést mutatva stabilan génmódosított sejtvonalak, primer sejtek és élőlények egész kollektívja hozható létre rövid idő alatt, reális kísérleti ráfordítással. A génmódosított élőlények létrehozása érdekében egy sejt (megtermékenyített zigóta) állapotban szükséges a virális génbevitel elvégzése.

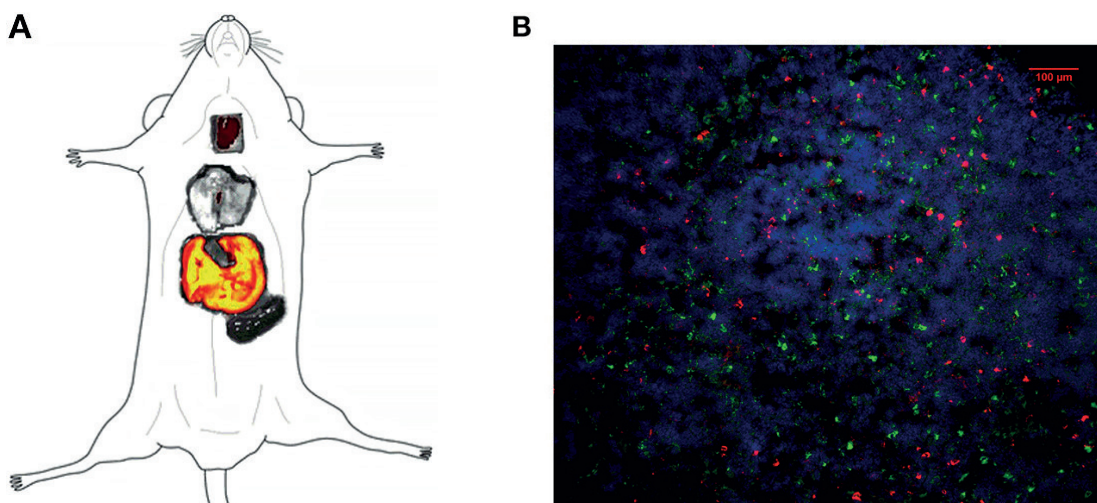
A szervezetben a szövetek közötti célzott kommunikációt az extracelluláris vezikulák teszik lehetővé, egyben megvédve a vezikulák bioaktív tartalmát (pl. peptidek, ligandok, miRNS-ek) a degradációs folyamatoktól. A folyamat számos egészséges és patológias folyamatban tetten érhető. (177-183) Munkacsoportunk a szelektív célba juttatást illetően fontos eredményeket ért el virális génbevitellel stabilan génmódosított (fokozott Wnt4 termelést biztosító) tímusz epitél sejtek által ter-



**41. ábra:** Lentivirális génbevitellel stabilan génmódosított sejtek és élőlények hozhatóak létre. Primer humán sejtekben különböző promoterek (pl. CAG, CMV) segítségével marker gén (pl. GFP) expresszálható (**balra fent és középen**, flow-cytometria). Marker gén mellett funkcionális gének is bevihetők (pl. vFLIP) (**jobbra fent**, flow-cytometria) melyek apoptózis-gátló hatása hasznosítható (**jobbra lent**, flow-cytometria). Zigóta állapotban alkalmazva lentivirális génbevitelt akár GM élőlény is létrehozható (**balra lent**, fotó kék fényben). *Forrás: Bovia et al. Blood 2003, Kvell et al. Mol Ther. 2005, Kvell et al. Trans Res. 2010.*

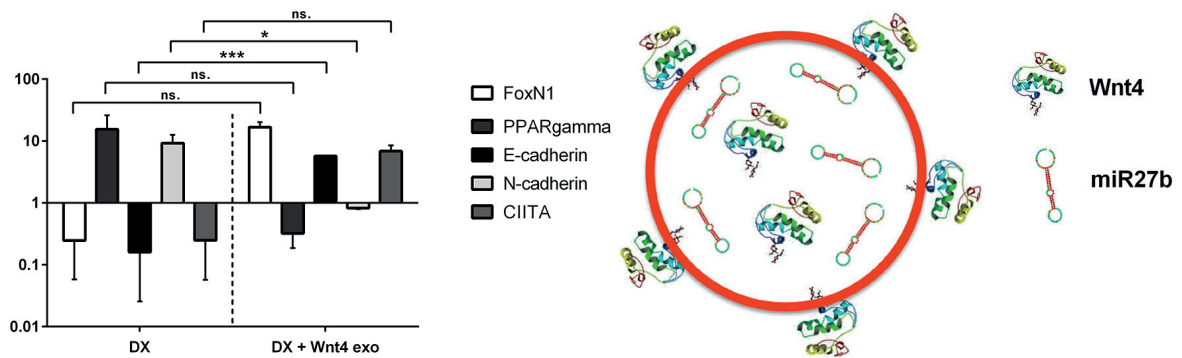
melt extracelluláris vezikulák kis mérettartományú frakciójával, exoszómákkal dolgozva. Eredményeink alapján *in vivo* alkalmazva a timusz epitél sejtek által termelt exoszómák fokozottan dúsulnak a timusz szövetben, ellensúlyozva a keringési okból történő elakadást a tüdő, máj és lép szöveteiben (**42. ábra**).

Eredményeink szerint a génmódosításnak köszönhetően fokozott Wnt4-tartalmú timusz epitél eredetű exoszómák *in vitro* sejtes modellben alkalmazva jelentősen képesek ellensúlyozni PPAR-



**42. ábra:** Timusz epitél sejtek által termelt exoszómák alkalmazása *in vivo*. DiI-festést követően a szöveti megoszlás alapján dúsulás mutatható ki a timuszban (**bal, A**). A timusz szövettani képén is azonosíthatók a DiI-festett exoszómák (**jobb, B**). *Forrás: Banfai et al. Front Immunol. 2019.*



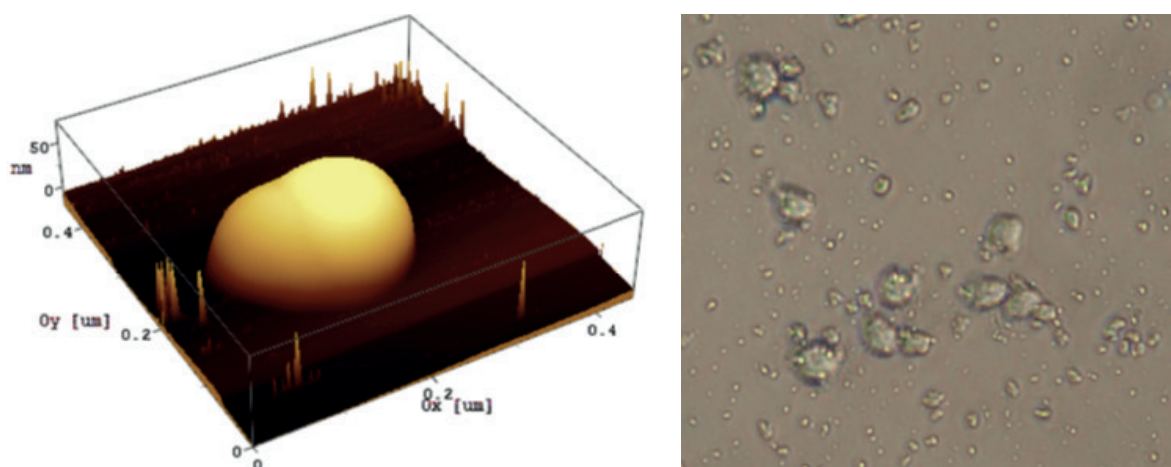


**43. ábra:** Tímusz epitél sejtek által termelt exoszómák alkalmazása *in vitro*. Szteroid (DX) hatására bekövetkező zsíros degeneráció kivédése, mRNS expresszió (bal). Eredményeink alapján készített sematikus ábra GM exoszómáról és tartalmáról (jobb). Forrás: Banfai et al. *Front Immunol.* 2019.

gamma útvonal fokozott aktivitása által okozott zsíros degenerációt (**43. ábra**). Lényegében helyreállítja a FoxN1 expressziót, megerősíti az epitél identitást és gátolja az EMT kialakulását. Érdekes módon járulékosan a PPARgamma-gátló miR27b-tartalom is növekszik az exoszómákban.

Az exoszomális irodalom szerint a szelektív szöveti célba-juttatás nem fehérje alapú receptor-ligand párokon, inkább lipid mintázatok révén valószínűsíthető, mely azonban hagyományos antitestes módszertannal nehezen vizsgálható. (209-211) Ezért munkacsoportunk a tímusz epitél sejtekből származó, természetes eredetű exoszómák használata mellett (melyek hatékonyan, de nehezen karakterizálható módon biztosítanak szöveti szelektivitást) a mesterséges eredetű szilika nanogyöngy és lipid nanopartikula platformok használatával is folytat kísérletet, a tímusz öregedési ütemének befolyásolására. Előzetes kísérleti eredményeink szerint az ilyen módon létrehozott, exoszóma-méretű mesterséges vezikulákat szintén hatékonyan felveszik emberi sejtek, azok rakományát képesek hasznosítani (**44. ábra**)

Alkalmazott kutatási szempontból mind a természetes exoszómák, mind a mesterséges szilika nanogyöngyök és lipid nanopartikulák használata rendelkezik előnyös illetve hátrányos tulajdonságokkal egyaránt. A természetes vezikulák esetében jól kihasználható a 'homing' jelensége: a tímusz epitél sejtek által termelt exoszómák előszeretettel dúsulnak a tímusz epitél sejtekben (ma még ismeretlen, vélhetően lipid mintázatoknak köszönhetően). Rakományuk igény szerint módosítható, a ter-



**44. ábra:** Mesterséges szilika nanogyöngy alkalmazása. Egyetlen nanogyöngy morfológiai megjelenítése (bal, AFM), és szilika nanogyöngyök alkalmazása emberi sejt kultúrán (jobb, fáziskontraszt-mikroszkópia). Forrás: *Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems*, 2019. október 10-11, Bécs, Ausztria

melő sejt stabil genetikai módosításán keresztül (pl. fokozott Wnt4 expresszió virális génbevitellel). S bár az exoszómák bioreaktoros termelése ma már léptékét tekintve növelhető egészen 500 literig, a gyógyszeripari hasznosításhoz ez még mindig kevés, ezért a termelés felskálázása nem nem kifizetődő. Exoszómák esetében a hosszú távú tárolás és szállítás szintén problémás és drága a jelenleg alkalmazott mély-fagyasztás (-80°C) alkalmazása miatt. (212-214) A mesterséges gyöngyök esetében más a helyzet. Itt megoldható az ipari léptékű termelési felskálázás, költséghatékonyan is, fokozott végkoncentráció érhető el, egyszerűbb a tárolás és szállítás (szilika esetében). Azonban a nanogyöngyök mesterséges volta miatt kérdéses azok biológiai megoszlása és lebomlása, mely további toxicitási kísérleteket igényel. (216-218)

## TÍMUSZ-SZELEKTÍV, REGENEROGÉN EXOSZÓMÁK TERMELÉSE BIOREAKTORBAN

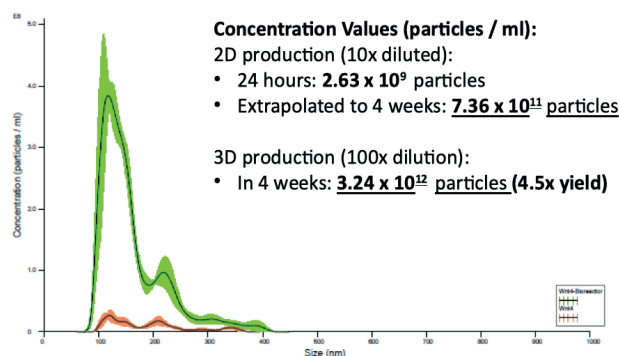
(Forrás: *MassivEV Conference, 2021. október 28-29, Brescia, Olaszország*)

Korábbi szövettani és állatkísérletes eredményeink alapján a tímusz epitél sejtek által termelt exoszómák fokozott szelektivitással jutnak el a tímuszba (lásd **38. ábra** fent). Szintén korábbi eredményeink szerint, amennyiben a termelő sejtek humán Wnt4 szekrécióra nézve transzgenikusak, úgy nagy mennyiségben bedúsul a Wnt4 az exoszómák belsejében és felszínén, melyet passzívan a szintén PPARgamma antagonistá hatású miR27b exoszómális bedúsulása is kísér (lásd **39. ábra** fent). Sejtek által termelt anyagok és partikulumok elvben számos bioreaktor rendszerben termeltethetők. (219, 220) Választásunk egy olyan rendszerre esett, amelyben az exoszómák termelését egy az adherens sejtekre és pilot termelési léptékre optimalizált 3D flow bioreaktor platform biztosítja, ahol folyamatos a friss médium recirkuláció az adherens sejtmatrixon keresztül egy kompakt, inkubátorban is használható összeállításban (37°C, 5% CO<sub>2</sub>, telített páratartalom). (221-222) A termelt exoszómák számát tekintve NTA (Nanosight) mérések alapján kb.  $3 \times 10^{12}$  exoszóma termelhető 100 mL médiumban 1 hónap folyamatos működtetéssel (**45. ábra**). Korábbi eredményeinkkel összevetve a 3D



### NANOSIGHT

Multi-Experiment



**45. ábra:** Exoszóma termelés bioreaktorban. Exoszómák termelésére a Merck / Sigma által forgalmazott 3D biotek flow bioreaktort használtuk (**bal**). Az exoszómák morfológiai paramétereit Nanosight berendezéssel értékeltük ki (**jobb**). Irodalmi forrás: Merck / Sigma honlap, forrás: *MassivEV Conference, 2021. október 28-29, Brescia, Olaszország*

flow bioreaktorban kb. 4-5× magasabb exoszóma termelési átlag érhető el, mint statikus 2D tenyésztés mellett. Exoszóma termelés tekintetében jelenleg a legnagyobb léptékű termelést biztosító rendszert a Codiak cég árulja. A Codiak bioreaktor esetében 500 L médiumban összesen  $10^{17}$  exoszóma termelése érhető el. (223)

kvell.krisztian\_95\_23

## ÖSSZEFOGLALÁS

A tímusz az immunrendszer egy gyorsan öregedő szövete, emberben már néhány éves korban kimutatható az öregedése. Pubertás során az öregedése felgyorsul szteroid hormonok hatására és 50 éves korra az epitél állomány többsége (kb. 80%) elvész. Azonban jelentős egyedi különbségek figyelhetők meg az egyének között a tímusz öregedésének sebességében, ezért eltérhet a tímusz esetében a funkcionális kor és a kronológiai kor. Ez már a kezdetektől szükségessé tette egy olyan precíz és érzékeny mérőmódszer alkalmazását, mellyel megállapítható a tímusz funkcionális kora. A timociták fejlődése során a génátrendeződés egy DNS hurok mellékterméket eredményez (hTREC), mely a perifériás vérben is kimutatható. Egy ismert, hagyományos qPCR alapú módszert adaptáltunk 3. generációs digitális PCR platformra, melynek előnye a korábbi platformhoz képest, hogy egyszerre fokozottan érzékeny és precíz, valamint hogy standard alkalmazása nélkül is objektív kópiaszámokat ad. (224) További hozzáadott érték, hogy DBS (szűrőpapíron beszáradt ujjbegy-eredetű vércsepp) formájában is használható a módszer. Ez lehetővé teszi a tímusz funkcionális kormeghatározását regionális szolgáltatás formájában, mivel postai úton is eljuttatható a minta. Ugyanezen módszer alkalmazható koraszülöttek immunológiai státuszának meghatározására, sportolók túledzetségének kimutatására, sugárzás biológiai hatásának mérésére, csontvelő-átültetést követően a tímusz regeneráció követésére, vagy kemoterápiás szerek tímusz-károsító hatásának kiértékelésére egyaránt.

Az egér és az ember embrionális fejlődésének összevetése természetesen különböző időskálán mozog, a tímusz esetében is. Egér esetében a 11. napon, míg ember esetében az ötödik héten jelenik meg a tímusz alapállománya, melyben egérben 1 nappal később, emberben 2 héttel később megjelennek a limfoid előalakok is. A lehetőségekhez mérten összevetettük a két faj magzati tímuszait molekuláris és szövettani szinten. Szövettani vizsgálatainkban mindkét faj esetében festettük a keratin-pozitív epitél alapállományt, és immunfluoreszcens festéseink eredményei szerint nagy mértékben expresszálják a Wnt4 ligandot és annak Fz4 receptorát az embrionális fejlődés során. Amennyiben gátoljuk ezt a jelátviteli útvonalat (pl. ICAT révén), úgy megreked a tímusz embrionális fejlődése és egy üres hólyagszerű képződmény keletkezik egér eredményeink alapján. Vagyis a Wnt4 jelátviteli útvonal aktivitása elengedhetetlen feltétele a tímusz embrionális fejlődésének, abban bármi nemű zavar komoly fejlődési rendellenességet okoz, melyet detektálható mind sejtmagi transzkripciós faktor (FoxN1), mind sejtfelszíni marker (MHCII), mind szekretált ligand szintjén (IL7). A Wnt4 nem csak a tímusz fejlődése során elengedhetetlen, számos más szövet fejlődésében, illetve betegségben is ismert a szerepe. (225) Ilyen a csontszövet fejlődése, ennek megfelelően fontos szerepe van csonttrikulásban. A hasnyálmirigy esetében a beta-szigetek kifejlődésében, így később a cukorbetegség kialakulásában valószínű a szerepe. A decidua sejtek fejlődése is Wnt4-függő, s valóban pre-eclampsia esetén is szerepet kap ez a jelátviteli tengely. A heggesedés folyamatába is beleszól a bőr, vese, a tüdő és a máj esetében. Ezen kívül számos daganatos folyamatban is ismert a Wnt4 hiperaktivitás etiológiai jelentősége. (225)

A Wnt4 jelátviteli tengely aktivitása nem csak embrionális korban fontos, felnőtt korban is folyamatosan szükséges a tímusz epitél sejtek identitásának fenntartásához, nélküle megszűnik a FoxN1 expresszió. Idős korban az egyik problémát pontosan a Wnt4 csökkenő szintje, és a kö-

vetkezményesen csökkenő FoxN1 expresszió jelenti. De nem csak a csökkenő Wnt4 ligand szintje okoz problémát, hanem a jelátviteli folyamatok receptorális szereplőinek megváltozása is. Egyrészt megemelkedik a Fz6 aránya a Fz4-hez képest, mely az intracelluláris gátló folyamatok túlsúlyához vezet. Másrészt a CTGF ligand expressziója jelentősen fokozódik, amely Fz8 receptorokon keresztül szintén a Wnt tengely gátlásához vezet. Ezek eredője (csökkenő Wnt4 expresszió és a Wnt jelátviteli folyamatok aktiváló hatásból gátló hatásba történő átcsapása) vezet az embrionális és fiatal felnőtt korban folyamatosan Wnt4-mediált és beta-catenin vezérelt majd FoxN1 által fenntartott tímusz epitél identitás olyan mértékű gyengüléséhez, hogy egyéb transzkripciós faktor megjelenése képes transz-differenciációt elindítani. A Wnt jelátviteli folyamatok átszerveződése az öregedés során a receptorok, ko-receptorok és szabályozó molekulák szintjén más szövetek esetében is tetten érhető, nem csak a tímuszban. Részt vesz az idegrendszer, izomrendszer, csontrendszer és az érrendszer fiziológias öregedési folyamataiban is. (226-229)

A tímusz alapállománya az öregedés során fokozatosan zsugorodik és zsírszövetnek adja át helyét, ezért zsíros involúciónak nevezik. Korábban vita tárgyát képezte a tímuszban megjelenő zsírszövet forrása. Elképzelhető volt külső eredetű zsírsejtes invázió és tímusz eredetű adipocita expanszió egyaránt. Molekuláris eredményeink és közvetlen szövettani megfigyeléseink szerint maguk a tímusz epitél sejtek alakulnak át zsírsejtekké. Ez a transz-differenciáció nem közvetlenül történik, hanem egy köztes mesenchymalis (fibroblaszt-szerű) állapot érintésével, mely az EMT révén lehetséges. Ahogy más kontextusokban, úgy a tímusz esetében is a PPARgamma transzkripciós faktor (és a tímuszban a LAP2alpha társ-transzkripciós faktor) az a domináns tényező, ami a zsírszövet kialakulását levezényli. Ezt követi az ADRP expresszió és a következményes intracelluláris lipid felhalmozódás. Egér modellben a tímusz öregedésének kinetikáját vizsgálva sikerült olyan életkort találni (15 hónapos kor), amikor fehérje szinten az epitél sejtek még expresszálják az EpCAM-1 epitél markert a sejtfelszínen, de már megjelenik a PPARgamma transzkripciós faktor a sejtmagban, és így a transz-differenciáció közvetlenül megjeleníthető. A PPARgamma, bár a zsírszövetek egy domináns transzkripciós faktora, érdekes módon szintén promiszkuus viselkedésű, pl. daganat-kezelések kapcsán. Gyakran megfigyelt jelenség, hogy adjuváns PPARgamma agonista kezelés hozzájárul a daganatellenes hatáshoz számos kezelés és daganattípus esetén (ún. anakoinosis). (230)

A tímusz alapállományát fokozatosan elfoglaló zsírszövet azonosítása a fehér-'beige'-barna zsírszöveti spektrumon nem volt ismert. Voltak olyan tényezők, melyek azt valószínűsítették, hogy a tímusz helyén megjelenő zsírszövet 'beige' irányban differenciálódik. Ilyen a parasternalis lokalizáció, az FGF21 jelenléte és maga a transz-differenciáció ténye. Számos módszertant párhuzamosan alkalmazva vizsgáltuk a tímusz helyén kialakuló zsírszövetet, egérben és emberben egyaránt. Ultra-strukturális vizsgálat szerint a lipidfelhalmozódás multi-lokuláris, vagyis több kisebb zárványban történik a sejtplazmában, mely a 'beige' és barna zsírszövetek jellemzője. Fluoreszcens mikroszkopos festés is megerősítette ezt a jellegzetes megjelenést. Génexpressziós szinten rögzíthető a TBX-1 és az UCP-1 emelkedése, melyek 'beige'-specifikus illetve 'beige'-indikatív markerek. További méréseink során a 'beige' zsírszövet kialakulását szabályozó miRNS eltéréseket is regisztráltunk a miR-27a, a miR-106b és a miR-155 esetében. Végül a metabolikus mintázat elvégzésével kapott OCR / ECAR arány is a 'beige' zsírszövetek jellemzője. Vagyis ultra-strukturális, miRNS, génexpressziós, szövettani és anyagcsere vizsgálataink szerint egybehangzóan *bona-fide* 'beige' zsírszövet keletkezik

a tímusz helyén a zsíros involúció során az öregedéssel. Egy érdekes, csoportunk által először megfigyelt és közölt megfigyelés a TBX-1 transzkripciós faktor kettős szerepe a tímusz életciklusa során. Embrionális korban a tímusz fejlődésében organogén, míg idős korban a zsíros degeneráció során 'beige' adipogén funkcióval rendelkeznek, így teljesen eltérő funkciókat képviselve a tímusz fejlődésében és öregedésében. Nem egyedülálló az, hogy egy transzkripciós faktor több funkciót is elláthat, eltérő kontextusokban. A Pax2/5/8 transzkripciós faktor család pl. a B-sejtek, az idegrendszer, a vese, a fül és a szem fejlődésében egyaránt fontos szerepet tölt be. (231) Természetesen távolabbi fajok esetében is ismert a transzkripciós faktorok multifunkciós jelensége, pl. akár rovarok vagy növények esetében is. (232, 233)

Az eddigiek alapján a PPARgamma transzkripciós faktor szerepe nélkülözhetetlen a tímusz zsíros involúciójának folyamatában, ahogy más zsírszövetek kialakulásában és egészséges működésében is. A PPARgamma hiányállapot által okozott fenotípus ismert egérben (KO) és emberben (FPLD3 ritka betegség) egyaránt, mindkét fajban lipodisztrófiát okozva. Egér esetében a heterozigóta állapot (PPARgamma<sup>+/-</sup>) még nem okoz anyagcsere eltéréseket, azonban emberben igen. Kollaborációban hozzáférésünk volt PPARgamma heterozigóta és KO felnőtt egerekhez (Debreceni Egyetem), illetve ritka betegség központon keresztül felnőtt emberi betegmintákhoz (Cambridge, Anglia). Megvizsgáltuk, hogy elméletünkkel összhangban a PPARgamma hiányállapot (a manifeszt lipodisztrófia betegség ellenére) megvédi-e a tímuszt a zsíros involúciótól, az öregedéstől. Eredményeink szerint mindkét fajban a vártnál magasabb TREC értékeket rögzítettünk digitális PCR platformunk segítségével. Vagyis a PPARgamma meggyengülése kedvez a tímusz funkcionális állapotának megőrzésében felnőtt és idős korban, bár természetesen a nem szelektív genetikai PPARgamma roncsolás számos egyéb metabolikus problémát okoz (ez a lipodisztrófiás betegség). Mellesleg a lipodisztrófiás állapot (lipidanyagcsere, cukoranyagcsere és egyéb metabolikus betegségek együtállása) már önmagában sem kedvez az immunrendszer funkcionalitásának. Ezért használtunk kontrollként olyan lipodisztrófiát okozó betegséget (FPLD2 / lamin mutáció) melynek hátterében a hasonló laboreltérések és fenotípus ellenére nem PPARgamma génhány áll (FPLD3 / PPARgamma mutáció). (234, 235) Idős korú PPARgamma heterozigóta egér esetében sikerült kimutatnunk azt is, hogy nem csak a friss naiv T-sejtek termelése megtartott, hanem ennek köszönhetően jobb (a fiatal állapothoz hasonló) a vakcinációs hatékonyság és az orális tolerancia is, melyekhez funkcionális friss naiv T-sejtekre van szükség. A zsírszövetek általános funkcionális roncsolása genetikai alapon (PPARgamma hiányállapot) tehát megvédi a tímuszt az öregedéssel járó zsíros involúciótól, de természetesen emberben terápiásan nem alkalmazható sem a szükséges genetikai módosítás, sem a következményes anyagcsere betegségek miatt. Ezért további kutatásainkban olyan egyéb külső tényezőket kerestünk, melyek szintén képesek befolyásolni a tímusz öregedését, a zsíros involúció sebességét.

Ennek kivitelezéséhez elengedhetetlen egy megbízható, lehetőség szerint egér és emberi sejtekkel egyaránt működő *in vitro* sejtmodell rendszer, mely kellően gyors és egyszerű nagy áteresztőképességű (HTS) szűrővizsgálatokhoz, valamint rendelkezik pozitív és negatív kezelési kontrollokkal a lehetséges végpontok rögzítéséhez. Munkacsoportunk létrehozott ilyen sejtmodellrendszert, melyben egér (TEP1) és emberi (1889c) tímusz epitél sejteken *in vitro* körülmények között vizsgálható egyes hatóanyagok progerogén (az öregedést és a zsíros degenerációt gyorsító) vagy regenerogén (az öregedést és a zsíros degenerációt lassító) hatása. Pozitív kontrollként szteroid kezelést (dexam-

tazon 1  $\mu\text{m}$  koncentrációban), míg negatív kontrollként Wnt4-tartalmú felülűsöt (a későbbiekben már exoszóma preparátumot) alkalmaztunk. Az *in vivo* pubertásban tapasztalható hasonlóan *in vitro* szteroid-kezelés hatására megindul a zsíros degeneráció, mely 5 nap után molekuláris biológiai módszerrel (PPAR $\gamma$  qPCR) és 7 nap után szövettani módszerrel (LipidTox fluoreszcens lipidfestés) jól kimutatható. A LipidTox festés a gyártó ajánlása szerint HTS módon alkalmazható sejt-tenyészetekben a vizsgált hatóanyagok adipogén hatásának gyors és hatékony szűrésére, eredetileg májsejtek esetében steatosis kialakulásának vizsgálatára. (236) A Wnt4 tartalmú felülűs (a későbbiekben már exoszóma preparátum) hatékonyan képes kivédeni a zsíros degenerációt a PPAR $\gamma$  tengelygátlása révén szteroid kezelés esetében, így potens negatív kontrollként alkalmazható. Az *in vitro* modellezhető, potenciálisan progerogén vagy regenerogén hatóanyagokat ezekben az egér és emberi sejtes modellrendszerben is vizsgálta munkacsoportunk. A fentiekén túlmenően a szteroid kezelés tímuszra kifejtett hatását *in vivo* is vizsgáltuk egérben, s eredményeink szerint már egyetlen kezelés hatására tartós károsodás mutatható ki molekuláris szinten az epitél állományban, mely új eredmény (korábban csak a timociták fokozott apoptózis-hajlama volt ismert szteroid kezelést követően).

Egyes természetes toxinok esetében ismert, hogy komplex *in vivo* hatással bírnak, számos sejttípusra és szövetre kihatnak, akár tartósan is. A munkacsoportunk által vizsgált toxinok között szerepelt a cuprizon és egyes kígyómérgek. A cuprizon demyelinizációs ágens tímuszra kifejtett pro-apoptotikus hatását *in vivo* egér modellben vizsgáltuk. A timociták mellett a tímusz epitél sejtek is apoptotikus károsodást szenvednek cuprizon hatására, mely új eredmény. Ezek alapján elképzelhető, hogy amennyiben toxikus környezeti hatások miatt szklerózis multiplex alakul ki, ott centrális immunrendszeri károsodás nyomait is érdemes lehet keresni emberben is. A munkacsoportunk által létrehozott és fent ismertetett *in vitro* sejtes modellben egyes kígyómérgek (*Bitis gabonica* Bg-toxin és *Dendroaspis angusticeps* Da-toxin) tímusz epitél sejtekre kifejtett hatását is megvizsgáltuk, mely korábban nem volt ismert. Célirányosan az apoptózis gének expressziójára kifejtett hatásukat vizsgáltuk. Ezek analízise alapján a piroptózis útvonalán keresztül fejthetik ki toxikus hatásukat a vizsgált kígyómérgek a tímusz epitél sejtekre, vagyis ha kígyómarást követően a keringéssel eljut távoli szövetekbe a kígyóméreg, akkor komoly (centrális) csapást mérhet az immunrendszerre, melynek hosszú távú immunpatológiai következményei is lehetnek. Kígyómarást követően előfordulhat citokin vihar, akárcsak egyes fertőzős betegségek esetében (pl. SARS2 / Covid19) vagy biológiai terápiák súlyos mellékhatása során (pl. SuperMAB / TGN1412). (237, 238) Minden ilyen esetben tartós immunrendszeri károsodás valószínűsíthető, élethosszig tartó fokozott immunpatológiai incidenciával.

Van olyan komplex külső életvitelbeli tényező, melynek hosszú távú vizsgálata nehezen kivitelezhető *in vitro* modellben, de még modell fajban végzett *in vivo* vizsgálatban is, ilyen a hormesis vagy rendszeres testmozgás. A mérsékelt rendszeres testmozgás tímuszra kifejtett hatását fiatal, korábban nem sportoló emberi alanyokon vizsgáltuk, fél éves időskálán, a tímusz (hTREC mérés) mellett hagyományos élettani és egyéb molekuláris paraméterek mérése révén. Mivel nagy számú tényező preconcepció-mentes vizsgálatára rendszerszinten törekedtünk, mesterséges neuronhálózatos kiértékelést is segítségül hívtunk. Meglepetésünkre a kiértékelte paraméterek között a tímusz funkcionalitására utaló hTREC érték kulcsparaméternek bizonyult, sokkal szorosabb korrelációt mutatott a rendszeres testmozgással, mint pl. a vérnyomásértékek, az éhgyomri cukor vagy a koleszterinszint,



és ugyanolyan domináns volt, mint az inzulinszint változása a rendszeres testmozgás hatására. Ez részben magyarázatot nyújthat arra, ami statisztikailag már régóta ismert: a rendszeres testmozgás csökkenti (egyebek mellett) a fertőző, daganatos és autoimmun betegségek előfordulásának kockázatát, melyekhez hozzájárulhatnak a friss naív, jól szelektált T-sejtek a fokozott tímusz funkcionalitás révén. Munkacsoportunk jelentős módszertani jártassággal rendelkezik exoszómák izolálásában, bioaktív tartalmuk (pl. miRNS) komplett analizisében. Az élettani, anyagcsere és immunológiai paraméterek mérése és kiértékelésén túl teljes exomiR (exoszomális miRNS) analízist is végeztünk, melynek révén sikerült tizenegy, erős kilengést mutató miRNS fajra szűkíteni a rendszeres testmozgás hatására megváltozott expressziót mutató miRNS-ek listáját. Irodalmi és adatbázisok alapján ez a szűk miRNS pool képes a legtöbb gyakori krónikus betegséget lefedni, azok kialakulásával szembeni prevenciót nyújtani (pl. kardio- és cerebrovaszkuláris események, anyagcsere betegségek, csontritkulás, daganatos betegségek, autoimmunitás, demencia stb.). Ez további molekuláris szintű magyarázatot nyújt a rendszeres testmozgás statisztikailag közismert betegség-megelőző hatásának magyarázatára. Mivel (kontrollal együtt) egy tucatnyi miRNS vizsgálatával lefedhető számos krónikus betegségre való hajlam kiértékelése, akár szűrővizsgálatra is használható, mely rendszeres alkalmazás esetén előre jelezhet betegségeket, még megjelenésük előtt. Az alkalmazási potenciál kiaknázása érdekében megkezdtük a tárgyalást miRNS szűrővizsgálatra szakosodott céggel (TamiRNA). (239)

Az egészséges embrionális fejlődés és az öregedés után munkacsoportunk kollaborációban vizsgálni tudta a Wnt4 jelátvitelt jóindulatú timómák és rosszindulatú tímusz karcinómák mintáiban egyaránt (ez valószínűleg ugyanazon entitás, és idővel a spektrumon vándorolva mindegyikük progresszív és fokozódó malignitást mutat). Eredményeink alapján a tímusz epitelsejtes daganataira is igaz, hogy túlélésük és osztódásuk nagy mértékben függ az aktív Wnt4 jelátviteltől, amit autokrin loop révén biztosítanak saját maguk számára (mely egyébként gyakori jelenség daganatok esetében). Ennek következtében a malignitás fokával is összefüggést mutat a Wnt4 termelés. Érdekes módon daganatokban is a Fz6 receptor használata élvez előnyt, talán a magasabb életkor miatt, mikor a daganatok megjelennek (a kor előrehaladtával eleve gyakoribb a Fz6 sejtfelszíni megjelenése, ahogy a daganatok előfordulása és malignitása is). Ez felhívja a figyelmet arra, hogy még tímusz szelektív Wnt4 alapú regeneratív eljárás esetén is fennáll a veszélye, hogy a meglévő de diagnosztizálatlan rezidens daganatsejtek proliferációjának kedvezzen a kezelés, ami veszélyforrást jelent. A tímusz esetében középkorúakban (az 5. évtizedben) tetőzik a tímusz daganatok megjelenésének valószínűsége, ami pont egybeesne egy potenciális öregedés-lassító Wnt4-kezelés optimális intervenció időszakával is. (240)

Ahogy láttuk, még tímusz esetében is fennáll a veszélye annak, hogy bár a Wnt4 jelátvitel erősítése és az ellentétes pólust képviselő PPARgamma jelátvitel gyengítése kedvezhet felnőtt korban a tímusz funkcionalitásának megőrzésében, ha felderítetlen daganatsejtek is jelen vannak azok szelektív növekedési előnyhöz juthatnak. Más szövetek esetében még egészséges viszonyok között is káros hatású lehet a PPARgamma jelátvitel gyengítése. Ez az anyagcsere funkciókhoz elengedhetetlen zsírszövetek esetében nyilvánvaló (lásd a PPARgamma génhiany okozta FPLD3 lipodisztrófiát emberben), de egyéb szövetek esetében is igaz. Emberi példánál maradván munkacsoportunk kollaborációban dolgozott porcszövet-tenyészetekkel és 3D tüdőmodellekkel. Mindkét esetben rendkívül

fontos a PPAR család jelátvitelének aktív működése. Porcsejtek esetében védő, regeneratív hatást képvisel a PPAR jelátvitel aktivitása gyulladásoz folyamat és következményesen kialakuló fibrózis és degeneráció ellen, valamint a makrofágok működését is befolyásolja és így közvetve magát az immunválaszt is. A PPAR jelátvitel meggyengítése elősegítené tehát az időskori osteoarthritis kialakulását, súlyosbítaná lefolyását. Tüdő esetében az ATII-es sejtpopuláció (mely a szöveti őssejteket forrása) folyamatosan pótolja az ATI-es (egyebek mellett a felületi feszültséget csökkentő SPC-t termelő) sejtpopulációt, ezzel fenntartva a szöveti homeosztázist. A folyamat csak aktív PPARgamma jelátvitel esetében zajlik megfelelő ütemben. A tüdő természetes öregedése során csökken a PPARgamma aktivitás, s részben ez felelős a tüdő öregedése során megfigyelhető pl. emphysemas felritkulások megjelenéséért. Mindezek következtében a tüdő szöveti kontextusában is ártalmas lenne a PPARgamma aktivitás csökkentése, meggyengítené a szöveti regenerációt és gyorsítaná a tüdő öregedésének folyamatát. A fentiek mutatják, hogy a PPAR család milyen sokoldalú, számos szerepet tölt be a kortól, szövettől, egészségi állapottól függően. Ez lehetőséget nyújthat részleges agonisták és antagonisták fejlesztése révén krónikus betegségek új terápiás megközelítésére. (241)

Ahogy bemutatásra került, munkacsoportunk jelentős tapasztalattal bír transzgenikus sejtek és élőlények létrehozásában. A genetikailag módosított sejtek által termelt extracelluláris vezikulák és azon belül az exoszómák tartalmát befolyásolják a termelő sejten elvégzett genetikai módosítás. Számos alkalommal és több módon bizonyítottuk, hogy a humán Wnt4 fehérjét termelő TEP1 egér tímusz epitél sejtvonal által termelt exoszómák magas Wnt4 tartalommal rendelkeznek, mellyel arányosan fokozott aktivitással is bírnak. Azt is bizonyítottuk, hogy *in vivo* szöveti megoszlás alapján a tímusz epitél sejtek által termelt exoszómák relatív dúsulást mutatnak a tímusz szövetben, mely egyfajta 'homing' jelenség. Ennek pontos mechanizmusa sajnos nem ismert, exoszómák esetében feltevések szerint nem receptor-ligand párok, vélhetően lipid mintázatok befolyásolják a folyamatot, azonban ennek vizsgálata standard módszertannal nehézkes. A természetes eredetű exoszómák egyik további előnye a 'homing' folyamatán túl, hogy képesek természetes szinergista molekulákat is bedúsítani, esetünkben ilyen a miR27b, mely szintén PPARgamma antagonista hatású, s így erősíti a Wnt4 által képviselt PPARgamma gátlást. Sajnos ezen természetes szinergista bedúsulás folyamata jelenleg szintén nem ismert pontosan. Ezek a párhuzamos mechanizmusok ('homing', szinergista bedúsulás), bár kedvező hatásúak, alkalmazott kutatási és lehetséges gyógyszerfejlesztési szempontból gyenge pontok az ismeretlen mechanizmusaik miatt. Az is tény, hogy jelen tudásunk szerint az exoszómák tárolása és szállítása a bioaktív tartalom megőrzése céljából mélyfagyasztott állapotban szükséges (-20°C rövid távon pl. hetek és -80°C hosszú távon pl. hónapok és évek esetében). Kis léptékű termelésüket munkacsoportunk már megoldotta (3D flow bioreaktor használatával). A nagyobb léptékű termelés kivitelezéséhez pedig léteznek piaci megoldások pl. a Codiak rendszer alkalmazásával. Mivel a fenti hátrányok azonban hangsúlyosak, szóba jöhet mesterséges vezikulák létrehozása is, pl. lipid nanopartikulák és szilika nanogyöngyök alkalmazása révén. A lipid nanopartikulák használata a SARS2 mRNS-alapú oltások széles körű bevezetésével vált ismertté és elfogadottá. Előállításuk egyszerre költséghatékony és gyors pl. Particle Works platform használatával. (242) Mesterséges előállításuk miatt rendkívül jól karakterizáltak, ami előnyös gyógyszerfejlesztési szempontból, de nem számíthatunk a karakterizálatlan járulékos előnyökre ('homing', szinergista bedúsulás). Tárolásuk és szállításuk pedig hasonlóan problémás (mélyfagyasztott állapotban lehetséges), mint az exoszómák

esetében, ahogy azt a SARS2 mRNS oltások is megmutatták. Ha ez utóbbi szempontok különösen hangsúlyosak és biológiailag stabil a hatóanyag, akkor jó megoldás lehet nanotechnológias csomagolás és célba juttatás kivitelezésére pl. szilika nanogyöngy hordozó használata is. Munkacsoportunk eredményesen használt szilika nanogyöngy hordozóval elegyített szteroid hatóanyagot makrofág sejtekbe történő szelektív célba juttatásra, valamint a termelés is gyors és olcsó volt, illetve a tárolás és a szállítás is egyszerűnek bizonyult. Azonban biológiailag labilis (pl. miRNS, citokin) hatóanyagok esetében ez a platform sajnos nem alkalmazható, így korlátozott a hasznosíthatósága. (243-245)

kvell.krisztian\_95\_23

## JÖVŐBELI TERVEK

A tímusz esetében végzett korábbi alap kutatásaink során a LAP2alpha szerepét vizsgálva azt találtuk, hogy elősegíti az epitél állomány zsíros degenerációját. Azonban ennél árnyaltabb az összkép a tímusz esetében a lamin és LAP család az öregedésben betöltött szerepével kapcsolatban. A lamin egy olyan maghártya struktúrelem, mely befolyásolja az adott sejtmag, és ezzel akár a teljes sejt merevségét is. Egyes kutatások szerint a lamin struktúrelemek szintjének csökkenése miatt idős korban a tímusz epitél sejtek génexpressziója és funkcionalitása csökkent mértékű. (246) Más kutatások a timociták idős korral járó fokozott merevségét és következményesen csökkent migrációs képességét tartják felelősnek a hanyatló tímusz funkciókért. (247) A laminopátiák egérben és emberben is progrogén hatásúak, vagyis gyorsult öregedést okoznak. Az egyes szövetek és szervek azonban eltérő sebességgel érintettek progéria esetén. Érdekes módon laminopátiás egérben kifejezett mértékű öregedést a tüdő és a tímusz szövege mutat, ugyanaz a két szövet, melyben a Wnt jelátvitel is kiemelt fontosságú. (248) Az, hogy a lamin és LAP család pontos szerepe összetett és árnyalt, egy rendszerszintű megközelítést tesz szükségessé, mely megfelelő bioinformatikai elemzőrendszer igényel. Munkacsoportunk hozzáféréssel rendelkezik IPA (Ingenuity Pathway Analysis, Qiagen) platform használatához. (249) Ez egy felhő alapú, rendszerszintű elemzésre alkalmas, mesterséges intelligenciát alkalmazó bioinformatikai platform. A szolgáltató cég (Qiagen) közel 200 fős élettudományban jártas gárdával folyamatosan elemzi és integrálja a Pubmed adatbázisban megjelenő releváns tudományos eredményeket, azokat forrással együtt megjelölve. IPA platform használata során a kutatási eredményeinkkel kapcsolatos irodalmi adatok egy releváns szegmense behívásra kerül, lehetővé téve többrétű (pl. kismolekulák, miRNS, gén expresszió), sejtkompartmentek szerinti (membrán, citoplazma, mag, mitokondrium) vagy jelátviteli útvonalak (osztódás, differenciáció, apoptózis) alapján kivitelezett és megjelenített, rendszerszintű analízist. Ez biztosítja saját és irodalmi eredmények szintézisét és értelmezését, valamint predikciók megfogalmazását. Reményeink szerint IPA alkalmazás segítségével közelebb kerülünk a laminok, a LAP család és konkrétan a LAP2alpha tímusz öregedésben betöltött pontos szerepének tisztázásához.

Technológiai fejlesztést is végzünk. A munkacsoportunk által 3D digitális PCR alapra adaptált hTREC assay továbbfejlesztése is zajlik a ThermoFisher céggel karöltve. Jövőbeli platformjuk az Absolute Q digitális PCR, mely a jelenleginél több fluoreszcens csatornát képes kezelni, gyorsabban és pontosabban mér, valamint alkalmas nagyobb elemszámú mérésre. Ennek megfelelően megkezdtük a hTREC assay adaptálását erre a platformra. A fluoreszcens csatornák bővülésének köszönhetően több paraméter mérhető egyidejűleg. Így lehetőség nyílik a hTREC mérés mellett egyidejű hKREC mérésre is (mely a csontvelő funkcionális kormeghatározására hivatott), méghozzá olyan módon, hogy további két endogén kontroll is alkalmazható. Az egyik az RnaseP DNS kontroll, mely a rendkívül pontos DNS kópiaszám / koncentráció-meghatározást tesz lehetővé, illetve további kontrollt a ROX fluoreszcens betöltőfesték nyújt. Ezek együttes alkalmazása képes a két primer immunológiai szövet (tímusz és csontvelő) funkcionális kormeghatározására kettős kontroll mellett, egyazon mintából, akár 1 csepp (50 µL) papíron tárolt és szállított vércseppből is. Ez ismereteink szerint a jelenleg elérhető legérzékenyebb és legprecízebb eszköz ilyen jellegű felhasználásra.

kvell.krisztian\_95\_23

## TÉZISEK FELSOROLÁSA

### ELMÉLETI FELFEDEZÉSEK

- Bizonyítottuk, hogy az egér és az emberi embrionális tímusz organogenezise megegyezik molekuláris szinten, egyaránt erősen függ a Wnt jelátvitel (azon belül a Wnt4) aktivitásától
- Részleteztük az öregedés során a tímusz epitél sejtek jelátviteli folyamatainak átszerveződését (csökkenő Fz4 arány, növekvő Fz6 és Fz8 arány, fokozott CTGF gátló ligand jelenlét)
- Azonosítottuk az öregedés során a tímusz epitél sejtek identitásának hanyatlásáért felelős molekulákat (csökkenő Wnt4, majd következményesen eltűnő FoxN1 expresszió)
- Azonosítottuk az öregedés során a tímusz epitél sejtek indirekt adipogén transz-differenciációjáért felelős molekulákat (emelkedő LAP2alpha és PPARgamma, magas ADRP expresszió)
- Bizonyítottuk, hogy az öregedés során a tímusz helyén megjelenő zsírszövet *bona fide* 'beige' zsírszövet (ultra-strukturális, molekuláris, sejtes, szöveti és anyagcsere szinten egyaránt)
- Leírtuk egérben és emberben a TBX-1 transzkripciós faktor kettős szerepét a tímusz teljes életciklusában (organogén szerep embrionális korban és 'beige' adipogén szerep felnőtt korban)
- Bizonyítottuk, hogy genetikai okból elmaradó tímusz zsíros degeneráció esetén (PPARgamma KO / FPLD3) a tímusz működése megtartott (magas TREC értékek) egérben és emberben
- Bizonyítottuk, hogy genetikai okból elmaradó tímusz zsíros degeneráció esetén (PPARgamma KO) az immunológiai funkciók (vakcinálás hatékonysága, orális tolerancia) megtartottak egérben
- Leírtuk egérben, hogy már egyszeri szteroid kezelés hatására is a tímusz epitél állománya tartósan (több mint 3 hónapra) károsodik molekuláris és szövettani szinten egyaránt
- Leírtuk egérben, hogy mesterséges eredetű toxikus vegyület (cuprizon) hatására a tímusz epitél állománya károsodik, és a folyamat apoptózis révén érvényesül
- Leírtuk emberi tímusz epitél sejteken természetes eredetű toxikus vegyületek (Bg és Da kígyómérgek) apoptózist-indukáló hatását, s hogy milyen génexpressziós változások révén hatnak
- Leírtuk emberben a rendszeres testmozgás tímusz regeneratív hatását (magas hTREC érték), mely mesterséges neuronhálózatos vizsgálat alapján egy domináns fiziológiai paraméter
- Azonosítottuk emberben a rendszeres testmozgás hatására legnagyobb eltérést mutató miRNS fajokot, melyek számos krónikus betegséget lefedve biztosítják a sport betegség-megelőző hatását
- Bizonyítottuk emberi tímusz daganatok esetében, hogy a malignitás mértékével arányosan Wnt4 autokrin hurok révén tartják fenn fokozott osztódásukat a daganatos sejtek
- Leírtuk tímusz epitél sejtekből származó exoszómák 'homing' jelenségét: erős hisztológiai kötődést mutatnak tímusz szövettani metszeten, illetve fokozott *in vivo* dúsulást egér tímuszban
- Leírtuk az ectopias humán Wnt4 over-expressziót mutató transzgenikus egér tímusz epitél sejtekből származó exoszómákban a Wnt4 fehérje fokozott jelenlétét és aktivitását
- Leírtuk tímusz epitél sejtekből származó exoszómákban az over-expresszált Wnt4 fehérje mellett a természetes módon bedúsuló és szintén PPARgamma antagonistá miR27b jelenlétét

## MÓDSZERTANI ÚJÍTÁSOK

- Adaptáltuk a hTREC mérést az egyszerre érzékeny és precíz 3D qPCR platformra a tímusz funkcionális korának meghatározásához, amely jelentősen eltérhet a kronológiai kortól
- Adaptáltuk a hTREC mérést szűrőpapírra beszárított vércseppre is (DBS), mely lehetővé teszi regionális szűrőközpont működtetését SCID mutációk újszülött-kori szűrővizsgálatára
- Kidolgoztunk *in vitro* rendszert egér (TEP1) és emberi (1889c) sejtekkel a tímusz epitél öregedésének modellezésére, progerogén (szteroid) és regenerogén (Wnt4) kontrollal
- Adaptáltunk nagy áteresztőképességű (HTS) rendszert egér (TEP1) és emberi (1889c) sejtekkel a tímusz epitél öregedését befolyásoló molekulák hatásának kimutatására (LipidTox festés)
- Kidolgoztunk természetes (Wnt4 exoszóma-alapú) a tímusz epitél sejtek öregedését lassító, *in vitro* és *in vivo* is alkalmazható regenerogén kezelést, megkezdjük a szabadalomkutatást
- Kidolgoztunk mesterséges (szteroid szilika nanogyöngy-alapú) tímusz epitél sejtek öregedését gyorsító, *in vitro* és *in vivo* alkalmazható progerogén kezelést, megkezdjük a szabadalomkutatást
- Kidolgoztunk a természetes (Wnt4 exoszóma-alapú) regenerogén kezeléshez pilot léptékű bioreaktoros (3D flow bioreaktor) termelési protokollt ( $3 \times 10^{12}$  exoszóma / 100 mL médium / hónap)



## KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Mély hálával tartozom mentoromnak **prof. Pongrácz Judit**nak. Bár nem volt doktori témámat tekintve témavezetőm, mégis látott bennem tudományos potenciált, melynek minden elképzelhető támogatást megadott az elmúlt 15 év során. Példaképem is egyben, nem csak tudományosan, hanem emberileg is! Csak remélni tudom, hogy nyomdokaiba léphetek és képes leszek méltó módon folytatni a közösen megkezdett munkát...

Köszönettel tartozom diplomadolgozatom és doktori témám vezetőinek is, **prof. Balogh Péter**nek és **prof. Németh Péter**nek. Az ő elhivatottságuk, szakmai tudásuk és szemléletük alapozta meg elköteleződésem az immunológiai és a biotechnológiai kutatások irányában. Bátorításuknak hála kiderült, hogy egy sejtbiológiában kisebb affinitású jelöltnek is lehet ígéretes jövője a molekuláris biológiában. S szerencsémre a molekuláris biológia egy rendkívül intenzíven fejlődő szakaszában támogatták is ilyen irányú törekvéseimet.

Kellemes és hasznos benyomásokat szereztem tartós külföldi tanulmányutam során **prof. Rudolf Zubler** csoportjában. Mellette megtanultam, hogy az átlagostól eltérő gondolkodásmód a tudományos kutatásban sokkal inkább áldás, semmint átok. Ennek köszönhetően a hagyományostól eltérő, akár innovatív kérdésfeltevés, az arra válaszul kidolgozott módszertan igen komoly előnyt jelenthet a kutatói érvényesülés rögzös útján.

Nagyon sokat köszönhetek **munkatársaim**nak is jelen és korábbi munkahelyeimen egyaránt. Inspiratív, pezsgő, egészségesen kompetitív légkört biztosítottunk kölcsönösen egymás számára. A csapatmunka fontosságára is felhívták figyelmem, mely nélkül lehetetlen komoly eredményeket elérni az élettudományi kutatások területén. Bizony barátságok, üzleti kapcsolatok, sőt ezek ritka kombinációja is köszönhető nekik és velük, közösen.

S természetesen köszönettel tartozom **családom és barátaim** felé is. Rendíthetetlenül támogatták törekvéseimet, megteremtették a feltételeit, hogy olthassam az élettudományok irányában elköteleződött tudásszomjamat, kitartottak mellettem, pedig kutatók mellett ez nem mindig egyszerű feladat... Köszönet és hála!

kvell.krisztian\_95\_23

## AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK FELSOROLÁSA

IF: 101.409, Q1(D1): 21(7) db, Q2: 2 db, Q3: 0 db, Q4: 0 db, besorolatlan: 2 db

Zhang X, Schalke B, **Kvell K**, Kriegsmann K, Kriegsmann M, Graeter T, Preissler G, Ott G, Kurz K, Bulut E, Ströbel P, Marx A, Belharazem D. WNT4 overexpression and secretion in thymic epithelial tumors drive an autocrine loop in tumor cells *in vitro*. **Front Oncol.** **2022** Jul 29;12:920871. doi: 10.3389/fonc.2022.920871. **Q1 IF: 6.244**

Garai K, Adam Z, Herczeg R, Banfai K, Gyebrovski A, Gyenesei A, Pongracz JE, Wilhelm M, **Kvell K**. Physical Activity as a Preventive Lifestyle Intervention Acts Through Specific Exosomal miRNA Species—Evidence From Human Short- and Long-Term Pilot Studies. **Front Physiol.** **2021** Aug 2;12:658218. doi: 10.3389/fphys.2021.658218. **Q1 IF: 4.566**

Boda F, Banfai K, Garai K, Kovacs B, Almasi A, Scheffer D, Sinkler RL, Csonka R, Czompoly T, **Kvell K**. Effect of *Bitis gabonica* and *Dendroaspis angusticeps* snake venoms on apoptosis-related genes in human thymic epithelial cells. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** **2020** Dec 14;26:e20200057. doi: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0057. **Q2 IF: 2.832**

Garai K, Adam Z, Herczeg R, Katai E, Nagy T, Pal S, Gyenesei A, Pongracz JE, Wilhelm M, **Kvell K**. Artificial Neural Network Correlation and Biostatistics Evaluation of Physiological and Molecular Parameters in Healthy Young Individuals Performing Regular Exercise. **Front Physiol.** **2019** Oct 2;10:1242. doi: 10.3389/fphys.2019.01242. **Q1 IF: 3.367**

Vas V, Háhner T, Kudlik G, Ernszt D, **Kvell K**, Kuti D, Kovács KJ, Tóvári J, Trexler M, Merő BL, Szeder B, Koprivanacz K, Buday L. Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. **Cells.** **2019** Aug 5;8(8):831. doi: 10.3390/cells8080831. **N/A IF: 4.366**

Banfai K, Ernszt D, Pap A, Bai P, Garai K, Belharazem D, Pongracz JE, **Kvell K**. „Beige” Cross Talk Between the Immune System and Metabolism. **Front Endocrinol (Lausanne).** **2019** Jun 18;10:369. doi: 10.3389/fendo.2019.00369. **Q1 IF: 3.644**

Banfai K, Garai K, Ernszt D, Pongracz JE, **Kvell K**. Transgenic Exosomes for Thymus Regeneration. **Front Immunol.** **2019** Apr 24;10:862. doi: 10.3389/fimmu.2019.00862. **Q1 IF: 5.085**

Boda F, Banfai K, Garai K, Curticapean A, Berta L, Sipos E, **Kvell K**. Effect of *Vipera ammodytes ammodytes* Snake Venom on the Human Cytokine Network. **Toxins (Basel).** **2018** Jun 25;10(7):259. doi: 10.3390/toxins10070259. **Q1 IF: 3.895**

Ernszt D, Banfai K, Kellermayer Z, Pap A, Lord JM, Pongracz JE, **Kvell K**. PPARgamma Deficiency Counteracts Thymic Senescence. **Front Immunol.** 2017 Nov 6;8:1515. doi: 10.3389/fimmu.2017.01515. **D1 IF: 5.511**

Rapp J, Jaromi L, **Kvell K**, Miskei G, Pongracz JE. WNT signaling—lung cancer is no exception. **Respir Res.** 2017 Sep 5;18(1):167. doi: 10.1186/s12931-017-0650-6. **Q1 IF: 3,751**

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. **D1 IF: 4.259**

Solti I\*, **Kvell K\***, Talaber G, Veto S, Acs P, Gallyas F Jr, Illes Z, Fekete K, Zalan P, Szanto A, Bogнар Z. Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. **PLoS One.** 2015 Jun 8;10(6):e0129217. doi: 10.1371/journal.pone.0129217. \*: megosztott elsőszerzőség **Q1 IF: 3.057**

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. **D1 IF: 6.340**

**Kvell K**, Fejes AV, Parnell SM, Pongracz JE. Active Wnt/beta-catenin signaling is required for embryonic thymic epithelial development and functionality *ex vivo*. **Immunobiology.** 2014 Aug;219(8):644-52. doi: 10.1016/j.imbio.2014.03.017. **Q1 IF: 3.044**

Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, Kovacs T, Avdicevic M, D'Souza VK, Rapp J, **Kvell K**, Jakab L, Nyitrai M, Molnar TF, Thickett DR, Laszlo T, Pongracz JE. Down-regulation of canonical and up-regulation of non-canonical Wnt signalling in the carcinogenic process of squamous cell lung carcinoma. **PLoS One.** 2013;8(3):e57393. doi: 10.1371/journal.pone.0057393. **Q1 IF: 3.534**

Szabo M, Czompoly T, **Kvell K**, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells. **Int Immunol.** 2012 Feb;24(2):79-87. doi: 10.1093/intimm/dxr105. **D1 IF: 3.134**

Talaber G, **Kvell K**, Varecza Z, Boldizsar F, Parnell SM, Jenkinson EJ, Anderson G, Berki T, Pongracz JE. Wnt-4 protects thymic epithelial cells against dexamethasone-induced senescence. **Rejuvenation Res.** 2011 Jun;14(3):241-8. Doi: 10.1089/rej.2010.1110. **Q2 IF: 3.826**

Varecza Z, **Kvell K**, Talabér G, Miskei G, Csongei V, Bartis D, Anderson G, Jenkinson EJ, Pongracz JE. Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence. **Mech Ageing Dev.** 2011 May;132(5):249-56. doi: 10.1016/j.mad.2011.04.007. **Q1 IF: 3.439**

Farkas B, **Kvell K**, Czömpöly T, Illés T, Bárdos T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. **Clin Orthop Relat Res.** **2010** Nov;468(11):3112-20. doi: 10.1007/s11999-010-1443-0. **D1 IF: 2.116**

**Kvell K**, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, Anderson G, Jenkinson EJ, Pongracz JE. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. **PLoS One.** **2010** May 18;5(5):e10701. doi: 10.1371/journal.pone.0010701. **Q1 IF: 4.411**

**Kvell K**, Czömpöly T, Hiripi L, Balogh P, Kóbor J, Bodrogi L, Pongrácz JE, Ritchie WA, Bosze Z. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. **Transgenic Res.** **2010** Feb;19(1):105-12. doi: 10.1007/s11248-009-9288-6. **Q1 IF: 2.569**

**Kvell K**, Cooper EL, Engelmann P, Bovari J, Nemeth P. Blurring borders: innate immunity with adaptive features. **Clin Dev Immunol.** **2007**;2007:83671. doi: 10.1155/2007/83671. **N/A N/A**

**Kvell K**, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. **Biochem Biophys Res Commun.** **2006** Mar 24;341(4):1193-202. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.083. **Q1 IF: 2.855**

**Kvell K**, Nguyen TH, Salmon P, Glauser F, Werner-Favre C, Barnet M, Schneider P, Trono D, Zubler RH. Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors. **Mol Ther.** **2005** Nov;12(5):892-9. doi: 10.1016/j.ymthe.2005.05.010. **D1 IF: 5.443**

Bovia F, Salmon P, Matthes T, **Kvell K**, Nguyen TH, Werner-Favre C, Barnet M, Nagy M, Leuba F, Arrighi JF, Piguet V, Trono D, Zubler RH. Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1-derived lentiviral vectors. **Blood.** **2003** Mar 1;101(5):1727-33. doi: 10.1182/blood-2001-12-0249. **D1 IF: 10.120**

kvell.krisztian\_95\_23

## **AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖNYVFEJEZETEK FELSOROLÁSA**

**Kvell K.** Thymic Senescence, In: Rezaei N, editor. **Thymus. InTech, 2019** May 24. doi: 10.5772/intechopen.87063

**Kvell K,** Pongracz JE. Immunosenescence and the Ageing Lung, In: Bueno V, editor. **The Ageing Immune System and Health, Springer, 2017** October. doi: 10.1007/978-3-319-43365-3\_6

**Kvell K,** Pongracz JE. Central Immune Senescence, Reversal Potentials. In: Nagata T, editor. **Senescence. InTech, 2012** Feb 29. Chapter 31. PMID: 28045481.

kvell.krisztian\_95\_23



## AZ ÉRTEKEZÉSEK ALAPJÁN SZERZETT PHD FOKOZATOK FELSOROLÁSA

**Garai Kitti** (50%-os témavezetés), 2022, PTE, ÁOK, Elméleti Orvostudományok, 'A rendszeres fizikai aktivitás egészségvédő hatásának háttérében álló molekuláris mechanizmusok vizsgálata', Summa cum laude

**Bánfai Krisztina** (100%-os témavezetés), 2021, PTE, ÁOK, Elméleti Orvostudományok, 'Extracelluláris vezikulák szerepe a tímusz öregedésének gátlásában', Summa cum laude

**Ernszt Dávid** (100%-os témavezetés), 2019, PTE, ÁOK, Elméleti Orvostudományok, 'A tímusz öregedésének molekuláris mechanizmusa: új intervenciós célpont azonosítása', Summa cum laude

**Kovács Tamás** (50%-os témavezetés), 2015, PTE, ÁOK, Elméleti Orvostudományok, 'Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence', Summa cum laude

kvell.krisztian\_95\_23

## **NEMZETKÖZI KONFERENCIA-RÉSZVÉTELEK FELSOROLÁSA**

International Society of Extracellular Vesicles, 2022. május 24-29, Lyon, Franciaország

Enhanced Drug Delivery Conference, 2022. május 5-6, London, Anglia

MassivEV Conference, 2021. október 28-29, Brescia, Olaszország

17<sup>th</sup> Novel Drug Delivery Systems, 2019. március 18-20, London, Anglia

Conference on Pharmaceutics and Drug Delivery Systems, 2019. október 10-11, Bécs, Ausztria

10<sup>th</sup> Novel Drug Delivery Systems, 2017. március 13-15, London, Anglia

International Society of Extracellular Vesicles, 2016. május 4-7, Rotterdam, Hollandia

Tissue Engineering and Regenerative Medicine, 2015 szeptember 8-11, Boston, MA, USA

Cell Conference on Regulatory RNAs, 2014 október 19-21, Berkeley, CA, USA

Biology of Aging, 2012 február 12-17, Gordon Conferences, Ventura, CA, USA

IV. SENS, 2009 szeptember 3-7, Queens' College, Cambridge, Anglia

Wnt 2009 Conference, 2009 június 11-14, Washington DC, USA

Transgenic Technology Meeting, 2008 október 27-29, TT2008, Torontó, Kanada

Wnt signaling, 2007 szeptember 12-15, MDCC, Berlin, Németország

Wnt 2007 Conference, University of California, San Diego, La Jolla, CA, USA

kvell.krisztian\_95\_23

## **NYERTES PÁLYÁZATOK FELSOROLÁSA**

PTE Proof of Concept pályázat: 5 mFt (2022)

PTE SZKK KA: 2,0 mFt (2022)

PTE Proof of Concept pályázat: 4 mFt (2021)

Richter Gedeon K+F Kutatási Szerződés: 18,8 mFt (2019-2021)

PTE SZKK KA: 2,0 mFt (2020)

ÚNKP/Bolyai+ pályázat: 2 mFt (2019-2020)

PTE SZKK KA: 2,0 mFt (2019)

ÚNKP/Bolyai+ pályázat: 2 mFt (2018-2019)

PTE Gyógyszerésztudományi Tehetség Centrum: 15 mFt (2018-2019)

PTE ÁOK KA: 2,8 mFt (2018-2020)

PTE Gyógyszerésztudományi Tehetség Centrum: 30 mFt (2017-2018)

ERC Mobility Grant: 3,0 mFt (2017)

PTE ÁOK KA: 2,8 mFt (2016-2018)

TÁMOP (4.1.2.E): 3 mFt (2015)

ANR-NKTH (Regulomix): 32 mFt (2009-2013)

OTKA PD 78310: 27 mFt (2006-2009)

kvell.krisztian\_95\_23

## **EGYETEMI TALÁLMÁNYOK FELSOROLÁSA**

Differenciáldiagnosztikai és terápia által kiváltott mellékhatást prediktáló exo-miR-ek  
(2022. PTE SZTAR: 1396789)

A testmozgás tüdődaganat-megelőző és -kezelő hatását utánozó liposzómák alkalmazása  
(2022. PTE SZTAR: 1350696)

Transzgenikus exoszómák az immunrendszer öregedésének gátlásában  
(2019. PTE SZTAR: 1147301)

Nanotechnológiás szteroid készítmény  
(2016. PTE SZTAR: 1052102)

Új módszer a beta-catenin-függő kanonikus Wnt jelátvitel aktivitásának tesztelésére  
(2013. PTE SZTAR: 1120303)

kvell.krisztian\_95\_23



## **NEMZETKÖZI TANULMÁNYUTAK FELSOROLÁSA**

IMT biotechnológiai centrum, 'Képzők képzése', Tours, Franciaország (2019)

ERC Mobility, Max-Planck Zentrum, Münster, Németország (2017)

IMT biotechnológiai centrum, 'Képzők képzése', Tours, Franciaország (2015)

Kísérleti Immunológiai Transzplantációs csoport, UCSF, San Francisco, CA, USA (2014)

Sanford Konzorcium, Regeneratív Medicina, UCSD, San Diego, CA, USA (2012)

Hematológiai Kutatócsoport, Genfi Egyetemi Kórház, Svájc (2001-2004)

kvell.krisztian\_95\_23

## SZCIENTOMETRIA (MTMT)

Kvell Krisztián (Immunológia, biotechnológia) tudományos és oktatói munkásságának összefoglalása  
MTA V. Orvostudományi Osztálya (2023.06.20)

Tudományos közlemények	Szám		Hivatkozások <sup>1</sup>	
	Összesen	Részletezve	Független	Összes
<b>I. Tudományos folyóiratcikk<sup>2</sup></b>	47			
szakcikk nemzetközi folyóiratban, idegen nyelvű		40	575	726
szakcikk hazai idegen nyelvű		0	0	0
szakcikk magyar nyelvű		0	0	0
szakcikk sokszerzős, érdemi szerzőként <sup>3</sup>		0	0	0
összefoglaló közlemény		4	122	138
rövid közlemény		3	35	38
<b>II. Könyvek</b>	1			
<b>a) Szakkönyv, kézikönyv, tankönyv szerzőként</b>	1			
idegen nyelvű		0	0	0
magyar nyelvű		0	0	0
aa) Felsőoktatási tankönyv		1	0	0
<b>b) Szakkönyv, kézikönyv, konferenciakötet, tankönyv szerkesztőként</b>	0			
idegen nyelvű		0		
magyar nyelvű		0		
bb) Felsőoktatási tankönyv		0		
<b>III. Könyvrészlet</b>	5			
idegen nyelvű		4	1	3
magyar nyelvű		0	0	0
cc) Felsőoktatási tankönyvfejezet		1	0	0
<b>IV. Konferenciaközlemény<sup>4</sup></b>	0		0	0
<b>Oktatási közlemények összesen (II.aa,bb-III.cc)</b>		2	0	0
<b>Tudományos közlemények összesen (I-IV)</b>		51	733	905
<b>Tudományos és oktatási közlemények összesen (I-IV.)</b>	53		733	905
<b>V. További tudományos művek</b>	16			
További tudományos művek, ide értve a nem teljes folyóiratcikket és a nem ismert lektorátságú folyóiratokban megjelent teljes folyóiratcikket is		15	0	0
Szerkesztőségi levelezés, hozzászólások, válaszok		1	1	1
Olthalmak (szabadalmak)		0	0	0
<b>VI. Hivatkozott absztraktok<sup>5</sup></b>	1		1	1
<b>Összes hivatkozás<sup>1</sup></b>			735	907
<b>Hirsch index<sup>6</sup></b>	19			
<b>g index<sup>6</sup></b>	29			

### Megjegyzések:

1 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli, a WoS és/vagy Scopus rendszerben nyilvántartott adatok

2 lektorált, tudományos folyóiratban

3 a szerző írásban nyilatkozik, hogy érdemi szerzői hozzájárulásával készültek szerzőként jegyzett közleményei, és az érdemi hozzájárulást dokumentálni tudja

4 konferenciaközlemény folyóiratban, könyvben vagy egyéb konferenciakötetben

5 nem-hivatkozott absztrakt itt nem kerül az összesítésbe

6 a disszertáció és egyéb típusú hivatkozás nélküli összes hivatkozással számolva. A Hirsch és a g index definíciója

Speciális tudományometriai adatok	Száma	Összes hivatkozás
Első szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	9	195
Utolsó szerzős teljes folyóiratcikkek száma <sup>2</sup>	7	53
A tudományos fokozat (PhD) elnyerése utáni (2008) teljes tudományos folyóiratcikkek száma	34	628
Az utolsó 10 év (2013-) tudományos, teljes, lektorált tudományos folyóiratcikkeinek száma	25	323
A legmagasabb hivatkozottságú közlemény hivatkozásainak száma (az összes hivatkozás százalékában)	89	9,81%
Hivatkozások száma, amelyek nem szerepelnek a WoS/Scopus rendszerben		118 + 0
Jelentés, guideline	0	0
Csoportos (multicentrikus) közleményben kollaborációs közreműködő <sup>7</sup>	0	0

**Megjegyzések:**

7 közreműködés esetén a csoportos szerzőségű közlemények hivatkozottsága külön értékelendő, és nem számítható be az összesített hivatkozások közé

n.a. = nincs adat

## IRODALOMJEGYZÉK

- 1: Rose MR, Flatt T, Graves JL, Greer LF, Martinez DE, Matos M, Mueller LD, Shmookler Reis RJ, Shahrestani P. What is Aging? *Front Genet.* 2012 Jul 20;3:134. doi: 10.3389/fgene.2012.00134.
- 2: Dixit VD. Impact of immune-metabolic interactions on age-related thymic demise and T cell senescence. *Semin Immunol.* 2012 Oct;24(5):321-30. doi: 10.1016/j.smim.2012.04.002.
- 3: Bauer ME, Jeckel CM, Luz C. The role of stress factors during aging of the immune system. *Ann N Y Acad Sci.* 2009 Feb;1153:139-52. doi: 10.1111/j.1749-6632.2008.03966.x.
- 4: Yan SX, Wei W. Castration reverses immunosenescence in aged mice. *Acta Pharmacol Sin.* 2011 Sep;32(9):1085-6. doi: 10.1038/aps.2011.110.
- 5: Franceschi C, Bonafè M. Centenarians as a model for healthy aging. *Biochem Soc Trans.* 2003 Apr;31(2):457-61. doi: 10.1042/bst0310457.
- 6: Castle SC. Impact of age-related immune dysfunction on risk of infections. *Z Gerontol Geriatr.* 2000 Oct;33(5):341-9. doi: 10.1007/s003910070030.
- 7: Miller JFAP, Marshall AHE, White RG (1962) The immunological significance of the thymus. *Adv Immunol* 2:111–162
- 8: Gui J, Mustachio LM, Su DM, Craig RW. Thymus Size and Age-related Thymic Involution: Early Programming, Sexual Dimorphism, Progenitors and Stroma. *Aging Dis.* 2012 Jun;3(3):280-90.
- 9: Aw D, Palmer DB. It's not all equal: a multiphasic theory of thymic involution. *Biogerontology.* 2012 Feb;13(1):77-81. doi: 10.1007/s10522-011-9349-0.
- 10: Aw D, Silva AB, Palmer DB. The effect of age on the phenotype and function of developing thymocytes. *J Comp Pathol.* 2010 Jan;142 Suppl 1:S45-59. doi: 10.1016/j.jcpa.2009.10.004.
- 11: Torroba M, Zapata AG. Aging of the vertebrate immune system. *Microsc Res Tech.* 2003 Dec 15;62(6):477-81. doi: 10.1002/jemt.10409.
- 12: Cavallotti C, D'Andrea V, Tonnarini G, Cavallotti C, Bruzzone P. Age-related changes in the human thymus studied with scanning electron microscopy. *Microsc Res Tech.* 2008 Aug;71(8):573-8. doi: 10.1002/jemt.20588.

- 13: Brelińska R. Thymic epithelial cells in age-dependent involution. *Microsc Res Tech*. 2003 Dec 15;62(6):488-500. doi: 10.1002/jemt.10410.
- 14: Heng TS, Goldberg GL, Gray DH, Sutherland JS, Chidgey AP, Boyd RL. Effects of castration on thymocyte development in two different models of thymic involution. *J Immunol*. 2005 Sep 1;175(5):2982-93. doi: 10.4049/jimmunol.175.5.2982.
- 15: Hince M, Sakkal S, Vlahos K, Dudakov J, Boyd R, Chidgey A. The role of sex steroids and gonadectomy in the control of thymic involution. *Cell Immunol*. 2008 Mar-Apr;252(1-2):122-38. doi: 10.1016/j.cellimm.2007.10.007.
- 16: Papadopoulou AS, Dooley J, Linterman MA, Pierson W, Ucar O, Kyewski B, Zuklys S, Hollander GA, Matthys P, Gray DH, De Strooper B, Liston A. The thymic epithelial microRNA network elevates the threshold for infection-associated thymic involution via miR-29a mediated suppression of the IFN- $\alpha$  receptor. *Nat Immunol*. 2011 Dec 18;13(2):181-7. doi: 10.1038/ni.2193.
- 17: Morley JE. Hormones and the aging process. *J Am Geriatr Soc*. 2003 Jul;51(7 Suppl):S333-7. doi: 10.1046/j.1365-2389.2003.51344.x.
- 18: Shanley DP, Aw D, Manley NR, Palmer DB. An evolutionary perspective on the mechanisms of immunosenescence. *Trends Immunol*. 2009 Jul;30(7):374-81. doi: 10.1016/j.it.2009.05.001.
- 19: Dooley J, Liston A. Molecular control over thymic involution: from cytokines and microRNA to aging and adipose tissue. *Eur J Immunol*. 2012 May;42(5):1073-9. doi: 10.1002/eji.201142305.
- 20: Min H, Montecino-Rodriguez E, Dorshkind K. Reassessing the role of growth hormone and sex steroids in thymic involution. *Clin Immunol*. 2006 Jan;118(1):117-23. doi: 10.1016/j.clim.2005.08.015.
- 21: Chen Y, Qiao S, Tuckermann J, Okret S, Jondal M. Thymus-derived glucocorticoids mediate androgen effects on thymocyte homeostasis. *FASEB J*. 2010 Dec;24(12):5043-51. doi: 10.1096/fj.10-168724.
- 22: Haynes BF, Sempowski GD, Wells AF, Hale LP. The human thymus during aging. *Immunol Res*. 2000;22(2-3):253-61. doi: 10.1385/IR:22:2-3:253.
- 23: Sempowski GD, Hale LP, Sundry JS, Massey JM, Koup RA, Douek DC, Patel DD, Haynes BF. Leukemia inhibitory factor, oncostatin M, IL-6, and stem cell factor mRNA expression in human thymus increases with age and is associated with thymic atrophy. *J Immunol*. 2000 Feb 15;164(4):2180-7. doi: 10.4049/jimmunol.164.4.2180.

- 24: Hernández-López C, Varas A, Sacedón R, Martínez VG, Hidalgo L, Valencia J, Zapata AG, Vicente A. The CXCL12/CXCR4 pair in aged human thymus. *Neuroimmunomodulation*. 2010;17(3):217-20. doi: 10.1159/000258728.
- 25: Aspinall R, Andrew D. Thymic involution in aging. *J Clin Immunol*. 2000 Jul;20(4):250-6. doi: 10.1023/a:1006611518223.
- 26: Flores KG, Li J, Sempowski GD, Haynes BF, Hale LP. Analysis of the human thymic perivascular space during aging. *J Clin Invest*. 1999 Oct;104(8):1031-9. doi: 10.1172/JCI7558.
- 27: Yang H, Youm YH, Vandanmagsar B, Rood J, Kumar KG, Butler AA, Dixit VD. Obesity accelerates thymic aging. *Blood*. 2009 Oct 29;114(18):3803-12. doi: 10.1182/blood-2009-03-213595.
- 28: Lynch HE, Goldberg GL, Chidgey A, Van den Brink MR, Boyd R, Sempowski GD. Thymic involution and immune reconstitution. *Trends Immunol*. 2009 Jul;30(7):366-73. doi: 10.1016/j.it.2009.04.003.
- 29: Holland AM, van den Brink MR. Rejuvenation of the aging T cell compartment. *Curr Opin Immunol*. 2009 Aug;21(4):454-9. doi: 10.1016/j.coi.2009.06.002.
- 30: Tilg H, Moschen AR. Adipocytokines: mediators linking adipose tissue, inflammation and immunity. *Nat Rev Immunol*. 2006 Oct;6(10):772-83. doi: 10.1038/nri1937.
- 31: Tinahones F, Salas J, Mayas MD, Ruiz-Villalba A, Macias-Gonzalez M, Garrido-Sanchez L, DeMora M, Moreno-Santos I, Bernal R, Cardona F, El Bekay R. VEGF gene expression in adult human thymus fat: a correlative study with hypoxic induced factor and cyclooxygenase-2. *PLoS One*. 2009 Dec 14;4(12):e8213. doi: 10.1371/journal.pone.0008213.
- 32: Cadigan KM, Nusse R. Wnt signaling: a common theme in animal development. *Genes Dev*. 1997 Dec 15;11(24):3286-305. doi: 10.1101/gad.11.24.3286.
- 33: Nusse R. WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet*. 1999 Jan;15(1):1-3. doi: 10.1016/s0168-9525(98)01634-5.
- 34: Roose J, Clevers H. TCF transcription factors: molecular switches in carcinogenesis. *Biochim Biophys Acta*. 1999 Oct 29;1424(2-3):M23-37. doi: 10.1016/s0304-419x(99)00026-8.
- 35: Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature*. 2000 Sep 28;407(6803):530-5. doi: 10.1038/35035117.

- 36: Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *EMBO J.* 1997 Jul 1;16(13):3797-804. doi: 10.1093/emboj/16.13.3797.
- 37: Itoh K, Krupnik VE, Sokol SY. Axis determination in *Xenopus* involves biochemical interactions of axin, glycogen synthase kinase 3 and beta-catenin. *Curr Biol.* 1998 May 7;8(10):591-4. doi: 10.1016/s0960-9822(98)70229-5.
- 38: van de Wetering M, Cavallo R, Dooijes D, van Beest M, van Es J, Loureiro J, Ypma A, Hursh D, Jones T, Bejsovec A, Peifer M, Mortin M, Clevers H. Armadillo coactivates transcription driven by the product of the *Drosophila* segment polarity gene dTCF. *Cell.* 1997 Mar 21;88(6):789-99. doi: 10.1016/s0092-8674(00)81925-x.
- 39: Molenaar M, van de Wetering M, Oosterwegel M, Peterson-Maduro J, Godsave S, Korinek V, Roose J, Destree O, Clevers H. XTcf-3 transcription factor mediates beta-catenin-induced axis formation in *Xenopus* embryos. *Cell.* 1996 Aug 9;86(3):391-9. doi: 10.1016/s0092-8674(00)80112-9.
- 40: Brunner E, Peter O, Schweizer L, Basler K. pangolin encodes a Lef-1 homologue that acts downstream of Armadillo to transduce the Wingless signal in *Drosophila*. *Nature.* 1997 Feb 27;385(6619):829-33. doi: 10.1038/385829a0.
- 41: Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 1996 Aug 15;382(6592):638-42. doi: 10.1038/382638a0.
- 42: Roose J, Molenaar M, Peterson J, Hurenkamp J, Brantjes H, Moerer P, van de Wetering M, Destree O, Clevers H. The *Xenopus* Wnt effector XTcf-3 interacts with Groucho-related transcriptional repressors. *Nature.* 1998 Oct 8;395(6702):608-12. doi: 10.1038/26989.
- 43: Staal FJ, Meeldijk J, Moerer P, Jay P, van de Weerd BC, Vainio S, Nolan GP, Clevers H. Wnt signaling is required for thymocyte development and activates Tcf-1 mediated transcription. *Eur J Immunol.* 2001 Jan;31(1):285-93. doi: 10.1002/1521-4141(200101)31:1<285::AID-IMMU285>3.0.CO;2-D.
- 44: Mulroy T, McMahon JA, Burakoff SJ, McMahon AP, Sen J. Wnt-1 and Wnt-4 regulate thymic cellularity. *Eur J Immunol.* 2002 Apr;32(4):967-71. doi: 10.1002/1521-4141(200204)32:4<967::AID-IMMU967>3.0.CO;2-6.
- 45: Ioannidis V, Beermann F, Clevers H, Held W. The beta-catenin--TCF-1 pathway ensures CD4(+) CD8(+) thymocyte survival. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):691-7. Doi: 10.1038/90623.



- 46: Gounari F, Aifantis I, Khazaie K, Hoeflinger S, Harada N, Taketo MM, von Boehmer H. Somatic activation of beta-catenin bypasses pre-TCR signaling and TCR selection in thymocyte development. *Nat Immunol.* 2001 Sep;2(9):863-9. doi: 10.1038/ni0901-863.
- 47: Balciunaite G, Keller MP, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, Mathieu YD, Gill J, Boyd R, Sussman DJ, Holländer GA. Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol.* 2002 Nov;3(11):1102-8. doi: 10.1038/ni850.
- 48: Evans RM. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science.* 1988 May 13;240(4854):889-95. doi: 10.1126/science.3283939.
- 49: Beato M, Chávez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids.* 1996 Apr;61(4):240-51. doi: 10.1016/0039-128x(96)00030-x.
- 50: Laudet V, Hänni C, Coll J, Catzeflis F, Stéhelin D. Evolution of the nuclear receptor gene superfamily. *EMBO J.* 1992 Mar;11(3):1003-13. doi: 10.1002/j.1460-2075.1992.tb05139.x.
- 51: Escriva H, Safi R, Hänni C, Langlois MC, Saumitou-Laprade P, Stehelin D, Capron A, Pierce R, Laudet V. Ligand binding was acquired during evolution of nuclear receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Jun 24;94(13):6803-8. doi: 10.1073/pnas.94.13.6803.
- 52: Krey G, Keller H, Mahfoudi A, Medin J, Ozato K, Dreyer C, Wahli W. Xenopus peroxisome proliferator activated receptors: genomic organization, response element recognition, heterodimer formation with retinoid X receptor and activation by fatty acids. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993 Dec;47(1-6):65-73. doi: 10.1016/0960-0760(93)90058-5.
- 53: Issemann I, Green S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators. *Nature.* 1990 Oct 18;347(6294):645-50. doi: 10.1038/347645a0.
- 54: Zhu Y, Alvares K, Huang Q, Rao MS, Reddy JK. Cloning of a new member of the peroxisome proliferator-activated receptor gene family from mouse liver. *J Biol Chem.* 1993 Dec 25;268(36):26817-20.
- 55: Sher T, Yi HF, McBride OW, Gonzalez FJ. cDNA cloning, chromosomal mapping, and functional characterization of the human peroxisome proliferator activated receptor. *Biochemistry.* 1993 Jun 1;32(21):5598-604. doi: 10.1021/bi00072a015.
- 56: Schmidt A, Endo N, Rutledge SJ, Vogel R, Shinar D, Rodan GA. Identification of a new member of the steroid hormone receptor superfamily that is activated by a peroxisome proliferator and fatty acids. *Mol Endocrinol.* 1992 Oct;6(10):1634-41. doi: 10.1210/mend.6.10.1333051.

- 57: Greene ME, Blumberg B, McBride OW, Yi HF, Kronquist K, Kwan K, Hsieh L, Greene G, Nimer SD. Isolation of the human peroxisome proliferator activated receptor gamma cDNA: expression in hematopoietic cells and chromosomal mapping. *Gene Expr.* 1995;4(4-5):281-99.
- 58: Fajas L, Fruchart JC, Auwerx J. PPARgamma3 mRNA: a distinct PPARgamma mRNA subtype transcribed from an independent promoter. *FEBS Lett.* 1998 Oct 30;438(1-2):55-60. doi: 10.1016/s0014-5793(98)01273-3.
- 59: Fajas L, Auboeuf D, Raspé E, Schoonjans K, Lefebvre AM, Saladin R, Najib J, Laville M, Fruchart JC, Deeb S, Vidal-Puig A, Flier J, Briggs MR, Staels B, Vidal H, Auwerx J. The organization, promoter analysis, and expression of the human PPARgamma gene. *J Biol Chem.* 1997 Jul 25;272(30):18779-89. doi: 10.1074/jbc.272.30.18779.
- 60: Ricote M, Huang J, Fajas L, Li A, Welch J, Najib J, Witztum JL, Auwerx J, Palinski W, Glass CK. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPARgamma) in human atherosclerosis and regulation in macrophages by colony stimulating factors and oxidized low density lipoprotein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998 Jun 23;95(13):7614-9. doi: 10.1073/pnas.95.13.7614.
- 61: Spiegelman BM. PPAR-gamma: adipogenic regulator and thiazolidinedione receptor. *Diabetes.* 1998 Apr;47(4):507-14. doi: 10.2337/diabetes.47.4.507.
- 62: Reginato MJ, Krakow SL, Bailey ST, Lazar MA. Prostaglandins promote and block adipogenesis through opposing effects on peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Biol Chem.* 1998 Jan 23;273(4):1855-8. doi: 10.1074/jbc.273.4.1855.
- 63: Greene ME, Pitts J, McCarville MA, Wang XS, Newport JA, Edelstein C, Lee F, Ghosh S, Chu S. PPARgamma: observations in the hematopoietic system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000 Jun;62(1):45-73. doi: 10.1016/s0090-6980(00)00075-7.
- 64: Huang JT, Welch JS, Ricote M, Binder CJ, Willson TM, Kelly C, Witztum JL, Funk CD, Conrad D, Glass CK. Interleukin-4-dependent production of PPAR-gamma ligands in macrophages by 12/15-lipoxygenase. *Nature.* 1999 Jul 22;400(6742):378-82. doi: 10.1038/22572.
- 65: Gelman L, Fruchart JC, Auwerx J. An update on the mechanisms of action of the peroxisome proliferator-activated receptors (PPARs) and their roles in inflammation and cancer. *Cell Mol Life Sci.* 1999 Jun;55(6-7):932-43. doi: 10.1007/s000180050345.
- 66: Fevrier B, Raposo G. Exosomes: endosomal-derived vesicles shipping extracellular messages. *Curr Opin Cell Biol* 2004 16:415–21. doi:10.1016/j.ceb.2004. 06.003

67: Kalra H, Simpson RJ, Ji H, Aikawa E, Altevogt P, Askenase P, Bond VC, Borràs FE, Breakefield X, Budnik V, Buzas E, Camussi G, Clayton A, Cocucci E, Falcon-Perez JM, Gabrielsson S, Gho YS, Gupta D, Harsha HC, Hendrix A, Hill AF, Inal JM, Jenster G, Krämer-Albers EM, Lim SK, Llorente A, Lötvall J, Marcilla A, Mincheva-Nilsson L, Nazarenko I, Nieuwland R, Nolte-`t Hoen EN, Pandey A, Patel T, Piper MG, Pluchino S, Prasad TS, Rajendran L, Raposo G, Record M, Reid GE, Sánchez-Madrid F, Schiffelers RM, Siljander P, Stensballe A, Stoorvogel W, Taylor D, Thery C, Valadi H, van Balkom BW, Vázquez J, Vidal M, Wauben MH, Yáñez-Mó M, Zoeller M, Mathivanan S. Vesicle- pedia: a compendium for extracellular vesicles with continuous community annotation. *PLoS Biol* 2012 10:e1001450. doi:10.1371/journal.pbio.1001450

68: Harding C, Heuser J, Stahl P. Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *J Cell Biol* 1983 97:329–39. doi:10.1083/jcb.97.2.329

69: Lotvall J, Valadi H. Cell to cell signalling via exosomes through esRNA. *Cell Adh Migr*. 2007 Jul-Sep, 1(3):156-8. doi: 10.4161/cam.1.3.5114.

70: Valadi H, Ekström K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO. Exosome- mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 2007 9:654–9. doi:10.1038/ncb1596

71: Pegtel DM, Cosmopoulos K, Thorley-Lawson DA, van Eijndhoven MA, Hopmans ES, Lindenberg JL, de Gruijl TD, Würdinger T, Middeldorp JM. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010 107:6328–33. doi:10.1073/pnas. 0914843107

72: Ridder K, Keller S, Dams M, Rupp AK, Schlaudraff J, Del Turco D, Starmann J, Macas J, Karpova D, Devraj K, Depboylu C, Landfried B, Arnold B, Plate KH, Höglinger G, Sülthmann H, Altevogt P, Momma S. Extracellular vesicle-mediated transfer of genetic information between the hematopoietic system and the brain in response to inflammation. *PLoS Biol* 2014 12(6):e1001874. doi:10.1371/journal.pbio.1001874

73: Michael A, Bajracharya SD, Yuen PS, Zhou H, Star RA, Illei GG, Alevizos I. Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis* 2010 16:34–8. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01604.x

74: CabyMP, LankarD, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C. Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol* 2005 17:879–87. doi:10.1093/intimm/dxh267

75: Admyre C, Grunewald J, Thyberg J, Gripenbäck S, Tornling G, Eklund A, Scheynius A, Gabrielsson S. Exosomes with major histocompatibility complex class II and co-stimulatory molecules are present in human BAL fluid. *Eur Respir J* 2003 22:578–83. doi:10.1183/09031936.03.00041703

76: Kanno K, Sasaki S, Hirata Y, Ishikawa S, Fushimi K, Nakanishi S, Bichet DG, Marumo F. Urinary excretion of aquaporin-2 in patients with diabetes insipidus. *N Engl J Med* 1995 332:1540–5. doi:10.1056/NEJM199506083322303

77: Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA. Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101:13368–73. doi:10.1073/pnas.0403453101

78: Taylor DD, Gercel-Taylor C. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 2008 110:13–21. doi:10.1016/j.ygyno.2008.04.033

79: Zitvogel L, Regnault A, Lozier A, Wolfers J, Flament C, Tenza D, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Amigorena S. Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine: dendritic cell-derived exosomes. *Nat Med* 1998 4:594–600. doi:10.1038/nm0598-594

80: Wolfers J, Lozier A, Raposo G, Regnault A, Théry C, Masurier C, Flament C, Pouzieux S, Faure F, Tursz T, Angevin E, Amigorena S, Zitvogel L. Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nat Med* 2001 7:297–303. doi:10.1038/85438

81: Raposo G, Nijman HW, Stoorvogel W, Liejendekker R, Harding CV, Melief CJ, Geuze HJ. B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. J Exp Med* 1996 183:1161–72. doi:10.1084/jem.183.3.1161

82: Karlsson M, Lundin S, Dahlgren U, Kahu H, Pettersson I, Telemo E. “Tolerosomes” are produced by intestinal epithelial cells. *Eur J Immunol* 2001 31:2892–900. doi:10.1002/1521-4141(200110)31:10<2892::AID-IMMU2892>3.0.CO;2-I

83: Ostman S, Taube M, Telemo E. Tolerosome-induced oral tolerance is MHC dependent. *Immunology* 2005 116:464–76. doi:10.1111/j.1365-2567.2005.02245.x

84: Wang GJ, Liu Y, Qin A, Shah SV, Deng ZB, Xiang X, Cheng Z, Liu C, Wang J, Zhang L, Grizzle WE, Zhang HG. Thymus exosomes-like particles induce regulatory T cells. *J Immunol.* 2008 Oct 15;181(8):5242-8. doi: 10.4049/jimmunol.181.8.5242.

85: Skogberg G, Gudmundsdottir J, van der Post S, Sandström K, Bruhn S, Benson M, Mincheva-Nilsson L, Baranov V, Telemo E, Ekwall O. Characterization of human thymic exosomes. *PLoS One.* 2013 Jul 2;8(7):e67554. doi: 10.1371/journal.pone.0067554.

86: Théry C, Boussac M, Véron P, Ricciardi-Castagnoli P, Raposo G, Garin J, Amigorena S. Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles. *J Immunol.* 2001 Jun 15;166(12):7309-18. doi: 10.4049/jimmunol.166.12.7309.

- 87: Lovato L, Cianti R, Gini B, Marconi S, Bianchi L, Armini A, Anghileri E, Locatelli F, Paoletti F, Franciotta D, Bini L, Bonetti B. Transketolase and 2',3'-cyclic-nucleotide 3'-phosphodiesterase type I isoforms are specifically recognized by IgG autoantibodies in multiple sclerosis patients. *Mol Cell Proteomics*. 2008 Dec;7(12):2337-49. doi: 10.1074/mcp.M700277-MCP200.
- 88: Gajbhiye R, Sonawani A, Khan S, Suryawanshi A, Kadam S, Warty N, Raut V, Khole V. Identification and validation of novel serum markers for early diagnosis of endometriosis. *Hum Reprod*. 2012 Feb;27(2):408-17. doi: 10.1093/humrep/der410.
- 89: Skogberg G, Lundberg V, Berglund M, Gudmundsdottir J, Telemo E, Lindgren S, Ekwall O. Human thymic epithelial primary cells produce exosomes carrying tissue-restricted antigens. *Immunol Cell Biol*. 2015 Sep;93(8):727-34. doi: 10.1038/icb.2015.33.
- 90: Ropke C. Thymic epithelial cell culture. *Microsc Res Tech* (1997) 38: 276–86. doi:10.1002/(SICI)1097-0029(19970801)38:3<276::AID-JEMT8>3.3.CO;2-6
- 91: Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 1990 247:718–21. doi:10.1126/science.1689076
- 92: Terato K, Shimozuru Y, Katayama K, Takemitsu Y, Yamashita I, Miyatsu M, Fujii K, Sagara M, Kobayashi S, Goto M, et al. Specificity of antibodies to type II collagen in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*. 1990 Oct;33(10):1493-500. doi: 10.1002/art.1780331006.
- 93: Chen XJ, Qiao J, Xiao BG, Lu CZ. The significance of titin antibodies in myasthenia gravis – correlation with thymoma and severity of myasthenia gravis. *J Neurol* 2004 251:1006–11. doi:10.1007/s00415-004-0479-z
- 94: Mallard K, Jones DB, Richmond J, McGill M, Foulis AK. Expression of the human heat shock protein 60 in thyroid, pancreatic, hepatic and adrenal autoimmunity. *J Autoimmun* (1996) 9:89–96. doi:10.1006/jaut.1996.0011 Dieterich W, Ehnis T, Bauer M, Donner P, Volta U, Riecken EO, et al. Identification of tissue transglutaminase as the autoantigen of celiac disease. *Nat Med* 1997 3:797–801. doi:10.1038/nm0797-797
- 95: Amagai M, Klaus-Kovtun V, Stanley JR. Autoantibodies against a novel epithelial cadherin in pemphigus vulgaris, a disease of cell adhesion. *Cell* 1991 67:869–77. doi:10.1016/0092-8674(91)90360-B
- 96: Giry-Laterrière M, Verhoeyen E, Salmon P. Lentiviral vectors. *Methods Mol Biol*. 2011;737:183-209. doi: 10.1007/978-1-61779-095-9\_8.

97: O'Doherty U, Swiggard WJ, Malim MH. Human immunodeficiency virus type 1 spinoculation enhances infection through virus binding. *J Virol.* 2000 Nov;74(21):10074-80. doi: 10.1128/jvi.74.21.10074-10080.2000.

98: Beardsley TR, Pierschbacher M, Wetzel GD, Hays EF. Induction of T-cell maturation by a cloned line of thymic epithelium (TEPI). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1983 Oct;80(19):6005-9. doi: 10.1073/pnas.80.19.6005.

99: Huang B, Belharazem D, Li L, Kneitz S, Schnabel PA, Rieker RJ, Körner D, Nix W, Schalke B, Müller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Ströbel P, Marx A. Anti-Apoptotic Signature in Thymic Squamous Cell Carcinomas - Functional Relevance of Anti-Apoptotic BIRC3 Expression in the Thymic Carcinoma Cell Line 1889c. *Front Oncol.* 2013 Dec 31;3:316. doi: 10.3389/fonc.2013.00316.

100: Hiripi L, Negre D, Cosset FL, Kvell K, Czömpöly T, Baranyi M, Góczy E, Hoffmann O, Bender B, Bosze Z. Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Res.* 2010 Oct;19(5):799-808. doi: 10.1007/s11248-009-9356-y.

101: Rezzani R, Nardo L, Favero G, Peroni M, Rodella LF. Thymus and aging: morphological, radiological, and functional overview. *Age (Dordr).* 2014 Feb;36(1):313-51. doi: 10.1007/s11357-013-9564-5.

102: Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, Su DM. The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int Immunol.* 2007 Oct;19(10):1201-11. doi: 10.1093/intimm/dxm095.

103: Hazenberg MD, Verschuren MC, Hamann D, Miedema F, van Dongen JJ. T cell receptor excision circles as markers for recent thymic emigrants: basic aspects, technical approach, and guidelines for interpretation. *J Mol Med (Berl).* 2001 Nov;79(11):631-40. doi: 10.1007/s001090100271.

104: Sempowski GD, Gooding ME, Liao HX, Le PT, Haynes BF. T cell receptor excision circle assessment of thymopoiesis in aging mice. *Mol Immunol.* 2002. Mar;38(11):841-8. doi: 10.1016/s0161-5890(01)00122-5.

105: Geenen V, Poulin JF, Dion ML, Martens H, Castermans E, Hansenne, Moutschen M, Sékaly RP, Cheynier R. Quantification of T cell receptor rearrangement excision circles to estimate thymic function: an important new tool for endocrine-immune physiology. *J Endocrinol.* 2003 Mar;176(3):305-11. doi: 10.1677/joe.0.1760305.

106: Dion ML, Sékaly RP, Cheynier R. Estimating thymic function through quantification of T-cell receptor excision circles. *Methods Mol Biol.* 2007;380:197-213. doi: 10.1007/978-1-59745-395-0\_12.

- 107: Mitchell WA, Lang PO, Aspinall R. Tracing thymic output in older individuals. *Clin Exp Immunol*. 2010 Sep;161(3):497-503. doi: 10.1111/j.1365-2249.2010.04209.x.
- 108: Ou XL, Gao J, Wang H, Wang HS, Lu HL, Sun HY. Predicting human age with bloodstains by sjTREC quantification. *PLoS One*. 2012;7(8):e42412. doi: 10.1371/journal.pone.0042412.
- 109: Routes J, Verbsky J. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency. *Curr Allergy Asthma Rep*. 2018 May 10;18(6):34. doi: 10.1007/s11882-018-0783-9.
- 110: Puck JM. Neonatal screening for severe combined immunodeficiency. *Curr Opin Pediatr*. 2011 Dec;23(6):667-73. doi: 10.1097/MOP.0b013e32834cb9b0.
- 111: Serana F, Chiarini M, Zanotti C, Sottini A, Bertoli D, Bosio A, Caimi L, Imberti L. Use of V(D) J recombination excision circles to identify T- and B-cell defects and to monitor the treatment in primary and acquired immunodeficiencies. *J Transl Med*. 2013 May 9;11:119. doi: 10.1186/1479-5876-11-119.
- 112: Chan SB, Zhong Y, Lim SCJ, Poh S, Teh KL, Soh JY, Chong CY, Thoon KC, Seng M, Tan ES, Arkachaisri T, Liew WK. Implementation of Universal Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in Singapore While Continuing Routine Bacille-Calmette-Guerin Vaccination Given at Birth. *Front Immunol*. 2022 Jan 3;12:794221. doi: 10.3389/fimmu.2021.794221.
- 113: Blom M, Bredius RGM, van der Burg M. Future Perspectives of Newborn Screening for Inborn Errors of Immunity. *Int J Neonatal Screen*. 2021 Nov 2;7(4):74. doi: 10.3390/ijns7040074.
- 114: Müller L, Pawelec G. Aging and immunity - impact of behavioral intervention. *Brain Behav Immun*. 2014 Jul;39:8-22. doi: 10.1016/j.bbi.2013.11.015.
- 115: Ventevogel MS, Sempowski GD. Thymic rejuvenation and aging. *Curr Opin Immunol*. 2013 Aug;25(4):516-22. doi: 10.1016/j.coi.2013.06.002.
- 116: Kuper CF, van Bilsen J, Cnossen H, Houben G, Garthoff J, Wolterbeek A. Development of immune organs and functioning in humans and test animals: Implications for immune intervention studies. *Reprod Toxicol*. 2016 Sep;64:180-90. doi: 10.1016/j.reprotox.2016.06.002.
- 117: Rezzani R, Bonomini F, Rodella LF. Histochemical and molecular overview of the thymus as site for T-cells development. *Prog Histochem Cytochem*. 2008;43(2):73-120. doi: 10.1016/j.proghi.2008.03.001.

- 118: Mohtashami M, Zúñiga-Pflücker JC. Three-dimensional architecture of the thymus is required to maintain delta-like expression necessary for inducing T cell development. *J Immunol.* 2006 Jan 15;176(2):730-4. doi: 10.4049/jimmunol.176.2.730.
- 119: Koyanagi A, Sekine C, Yagita H. Expression of Notch receptors and ligands on immature and mature T cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2012 Feb 24;418(4):799-805. doi: 10.1016/j.bbrc.2012.01.106.
- 120: Anderson G, Pongracz J, Parnell S, Jenkinson EJ. Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol.* 2001 Nov;31(11):3349-54. doi: 10.1002/1521-4141(200111)31:11<3349::aid-immu3349>3.0.co;2-s.
- 121: Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G, Jenkinson EJ. Thymic epithelial cells provide WNT signals to developing thymocytes. *Eur J Immunol.* 2003 Jul;33(7):1949-56. doi: 10.1002/eji.200323564.
- 122: Bleul CC, Boehm T. BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol.* 2005 Oct 15;175(8):5213-21. doi: 10.4049/jimmunol.175.8.5213.
- 123: Chen Y, Liu X, Liu Y, Wang Y, Wang H, Lu C, Zhang P. Decreased Wnt4 expression inhibits thymoma development through downregulation of FoxN1. *J Thorac Dis.* 2017 Jun;9(6):1574-1583. doi: 10.21037/jtd.2017.05.28.
- 124: Pongracz JE, Parnell SM, Jones T, Anderson G, Jenkinson EJ. Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur J Immunol.* 2006 Sep;36(9):2376-83. Doi: 10.1002/eji.200535721.
- 125: Gao S, Li X, Amendt BA. Understanding the role of Tbx1 as a candidate gene for 22q11.2 deletion syndrome. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013 Dec;13(6):613-21. doi: 10.1007/s11882-013-0384-6.
- 126: Jerome LA, Papaioannou VE. DiGeorge syndrome phenotype in mice mutant for the T-box gene, Tbx1. *Nat Genet.* 2001 Mar;27(3):286-91. doi: 10.1038/85845.
- 127: Sirianni MC, Businco L, Seminara R, Aiuti F. Severe combined immunodeficiencies, primary T-cell defects and DiGeorge syndrome in humans: characterization by monoclonal antibodies and natural killer cell activity. *Clin Immunol Immunopathol.* 1983 Sep;28(3):361-70. Doi: 10.1016/0090-1229(83)90103-4.
- 128: Kühl M, Pandur P. Dorsal axis duplication as a functional readout for Wnt activity. *Methods Mol Biol.* 2008;469:467-76. doi: 10.1007/978-1-60327-469-29.



- 129: Schulte G, Bryja V. The Frizzled family of unconventional G-protein-coupled receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 2007 Oct;28(10):518-25. doi: 10.1016/j.tips.2007.09.001.
- 130: Malbon CC, Wang H, Moon RT. Wnt signaling and heterotrimeric G-proteins: strange bed-fellows or a classic romance? *Biochem Biophys Res Commun.* 2001 Sep 28;287(3):589-93. doi: 10.1006/bbrc.2001.5630.
- 131: Ossipova O, Bardeesy N, DePinho RA, Green JB. LKB1 (XEEK1) regulates Wnt signalling in vertebrate development. *Nat Cell Biol.* 2003 Oct;5(10):889-94. doi: 10.1038/ncb1048.
- 132: Kinoshita N, Iioka H, Miyakoshi A, Ueno N. PKC delta is essential for Dishevelled function in a noncanonical Wnt pathway that regulates *Xenopus* convergent extension movements. *Genes Dev.* 2003 Jul 1;17(13):1663-76. doi:10.1101/gad.1101303.
- 133: Kvell K, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, Anderson G, Jenkinson EJ, Pongracz JE. Wnt4 and LAP2alpha as pacemakers of thymic epithelial senescence. *PLoS One.* 2010 May 18;5(5):e10701. doi: 10.1371/journal.pone.0010701.
- 134: Kondo K, Ohigashi I, Takahama Y. Thymus machinery for T-cell selection. *Int Immunol.* 2019 Mar 5;31(3):119-125. doi: 10.1093/intimm/dxy081.
- 135: Hakim FT, Gress RE. Thymic involution: implications for self-tolerance. *Methods Mol Biol.* 2007;380:377-90. doi: 10.1007/978-1-59745-395-0\_24.
- 136: Marinova TT. Epithelial framework reorganization during human thymus involution. *Gerontology.* 2005 Jan-Feb;51(1):14-8. Doi: 10.1159/000081429.
- 137: Mota de Sá P, Richard AJ, Hang H, Stephens JM. Transcriptional Regulation of Adipogenesis. *Compr Physiol.* 2017 Mar 16;7(2):635-674. doi: 10.1002/cphy.c160022.
- 138: Berger R, Theodor L, Shoham J, Gokkel E, Brok-Simoni F, Avraham KB, Copeland NG, Jenkins NA, Rechavi G, Simon AJ. The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res.* 1996 May;6(5):361-70. doi: 10.1101/gr.6.5.361.
- 139: Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA. Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci.* 2001 Jan;114(Pt 1):9-19. doi: 10.1242/jcs.114.1.9.

- 140: Dechat T, Vlcek S, Foisner R. Review: lamina-associated polypeptide 2 isoforms and related proteins in cell cycle-dependent nuclear structure dynamics. *J Struct Biol.* 2000 Apr;129(2-3):335-45. doi: 10.1006/jsbi.2000.4212.
- 141: Vlcek S, Korbei B, Foisner R. Distinct functions of the unique C terminus of LAP2alpha in cell proliferation and nuclear assembly. *J Biol Chem.* 2002 May 24;277(21):18898-907. doi: 10.1074/jbc.M200048200.
- 142: Dorner D, Vlcek S, Foeger N, Gajewski A, Makolm C, Gotzmann J, Hutchison CJ, Foisner R. Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol.* 2006 Apr 10;173(1):83-93. doi: 10.1083/jcb.200511149.
- 143: Dorner D, Vlcek S, Foeger N, Gajewski A, Makolm C, Gotzmann J, Hutchison CJ, Foisner R. Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol.* 2006 Apr 10;173(1):83-93. doi: 10.1083/jcb.200511149.
- 144: Dreger M, Otto H, Neubauer G, Mann M, Hucho F. Identification of phosphorylation sites in native lamina-associated polypeptide 2 beta. *Biochemistry.* 1999 Jul 20;38(29):9426-34. doi: 10.1021/bi990645f.
- 145: Liang Z, Dong X, Zhang Z, Zhang Q, Zhao Y. Age-related thymic involution: Mechanisms and functional impact. *Aging Cell.* 2022 Aug;21(8):e13671. doi: 10.1111/accel.13671.
- 146: Dixit VD. Thymic fatness and approaches to enhance thymopoietic fitness in aging. *Curr Opin Immunol.* 2010 Aug;22(4):521-8. doi: 10.1016/j.coi.2010.06.010.
- 147: Tang W, Zeve D, Suh JM, Bosnakovski D, Kyba M, Hammer RE, Tallquist MD, Graff JM. White fat progenitor cells reside in the adipose vasculature. *Science.* 2008 Oct 24;322(5901):583-6. doi: 10.1126/science.1156232.
- 148: Brachvogel B, Moch H, Pausch F, Schlötzer-Schrehardt U, Hofmann C, Hallmann R, von der Mark K, Winkler T, Pöschl E. Perivascular cells expressing annexin A5 define a novel mesenchymal stem cell-like population with the capacity to differentiate into multiple mesenchymal lineages. *Development.* 2005 Jun;132(11):2657-68. doi: 10.1242/dev.01846.
- 149: Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell.* 2009 Nov 25;139(5):871-90. doi: 10.1016/j.cell.2009.11.007.
- 150: Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest.* 2009 Jun;119(6):1429-37. doi: 10.1172/JCI36183.

- 151: Zeisberg EM, Tarnavski O, Zeisberg M, Dorfman AL, McMullen JR, Gustafsson E, Chandraker A, Yuan X, Pu WT, Roberts AB, Neilson EG, Sayegh MH, Izumo S, Kalluri R. Endothelial-to-mesenchymal transition contributes to cardiac fibrosis. *Nat Med*. 2007 Aug;13(8):952-61. doi: 10.1038/nm1613.
- 152: Youm YH, Yang H, Sun Y, Smith RG, Manley NR, Vandanmagsar B, Dixit VD. Deficient ghrelin receptor-mediated signaling compromises thymic stromal cell microenvironment by accelerating thymic adiposity. *J Biol Chem*. 2009 Mar 13;284(11):7068-77. doi: 10.1074/jbc.M808302200.
- 153: Yang H, Youm YH, Dixit VD. Inhibition of thymic adipogenesis by caloric restriction is coupled with reduction in age-related thymic involution. *J Immunol*. 2009 Sep 1;183(5):3040-52. doi: 10.4049/jimmunol.0900562.
- 154: Gaborit B, Venteclef N, Ancel P, Pelloux V, Gariboldi V, Leprince P, Amour J, Hatem SN, Jouve E, Dutour A, Clément K. Human epicardial adipose tissue has a specific transcriptomic signature depending on its anatomical peri-atrial, peri-ventricular, or peri-coronary location. *Cardiovasc Res*. 2015 Oct 1;108(1):62-73. doi: 10.1093/cvr/cvv208.
- 155: Langhi LG, Andrade LR, Shimabukuro MK, van Ewijk W, Taub DD, Borojevic R, de Mello Coelho V. Lipid-Laden Multilocular Cells in the Aging Thymus Are Phenotypically Heterogeneous. *PLoS One*. 2015 Oct 28;10(10):e0141516. doi: 10.1371/journal.pone.0141516.
- 156: Wu J, Boström P, Sparks LM, Ye L, Choi JH, Giang AH, Khandekar M, Virtanen KA, Nuutila P, Schaart G, Huang K, Tu H, van Marken Lichtenbelt WD, Hoeks J, Enerbäck S, Schrauwen P, Spiegelman BM. Beige adipocytes are a distinct type of thermogenic fat cell in mouse and human. *Cell*. 2012 Jul 20;150(2):366-76. doi: 10.1016/j.cell.2012.05.016.
- 157: Giralt M, Villarroya F. White, brown, beige/brite: different adipose cells for different functions? *Endocrinology*. 2013 Sep;154(9):2992-3000. doi: 10.1210/en.2013-1403.
- 158: Cinti S. Adipocyte differentiation and transdifferentiation: plasticity of the adipose organ. *J Endocrinol Invest*. 2002 Nov;25(10):823-35. doi: 10.1007/BF03344046.
- 159: Ikeda K, Maretich P, Kajimura S. The Common and Distinct Features of Brown and Beige Adipocytes. *Trends Endocrinol Metab*. 2018 Mar;29(3):191-200. doi: 10.1016/j.tem.2018.01.001.
- 160: Frigolet ME, Gutiérrez-Aguilar R. The colors of adipose tissue. *Gac Med Mex*. 2020;156(2):142-149. English. doi: 10.24875/GMM.M20000356.
- 161: Kvell K. Thymic Senescence, In: Rezaei N, editor. *Thymus*. InTech, 2019 May 24. doi: 10.5772/intechopen.87063

162: Greene ME, Pitts J, McCarville MA, Wang XS, Newport JA, Edelstein C, Lee F, Ghosh S, Chu S. PPARgamma: observations in the hematopoietic system. *Prostaglandins Other Lipid Mediat.* 2000 Jun;62(1):45-73. doi: 10.1016/s0090-6980(00)00075-7. PMID: 10936415.

163: Youm YH, Yang H, Amin R, Smith SR, Leff T, Dixit VD. Thiazolidinedione treatment and constitutive-PPARgamma activation induces ectopic adipogenesis and promotes age-related thymic involution. *Aging Cell.* 2010 Aug;9(4):478-89. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00574.x.

164: 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. PMID: 27711054; PMCID: PMC5053279.

165: Vas V, Háhner T, Kudlik G, Ernszt D, Kvell K, Kuti D, Kovács KJ, Tóvári J, Trexler M, Merő BL, Szeder B, Koprivanacz K, Buday L. Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing. *Cells.* 2019 Aug 5;8(8):831. doi: 10.3390/cells8080831.

166: Taves MD, Ashwell JD. Effects of sex steroids on thymic epithelium and thymocyte development. *Front Immunol.* 2022 Sep 2;13:975858. doi: 10.3389/fimmu.2022.975858.

167: Burin SM, Menaldo DL, Sampaio SV, Frantz FG, Castro FA. An overview of the immune modulating effects of enzymatic toxins from snake venoms. *Int J Biol Macromol.* 2018 Apr 1;109:664-671. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2017.12.101.

168: Mukai K, Tsai M, Starkl P, Marichal T, Galli SJ. IgE and mast cells in host defense against parasites and venoms. *Semin Immunopathol.* 2016 Sep;38(5):581-603. doi: 10.1007/s00281-016-0565-1.

169: Barja-Fidalgo C, Coelho AL, Saldanha-Gama R, Helal-Neto E, Mariano-Oliveira A, Freitas MS. Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin- coupled signaling and modulate leukocyte functions. *Braz J Med Biol Res.* 2005 Oct;38(10):1513-20. doi: 10.1590/s0100-879x2005001000008.

170: Cañas CA, Castaño-Valencia S, Castro-Herrera F, Cañas F, Tobón GJ. Biomedical applications of snake venom: from basic science to autoimmunity and rheumatology. *J Transl Autoimmun.* 2020 Dec 14;4:100076. doi: 10.1016/j.jtauto.2020.100076.

171: Cesar PHS, Braga MA, Trento MVC, Menaldo DL, Marcussi S. Snake Venom Disintegrins: An Overview of their Interaction with Integrins. *Curr Drug Targets.* 2019;20(4):465-477. doi: 10.2174/1389450119666181022154737.

- 172: Olaoba OT, Karina Dos Santos P, Selistre-de-Araujo HS, Ferreira de Souza DH. Snake Venom Metalloproteinases (SVMs): A structure-function update. *Toxicon* X. 2020 Jul 21;7:100052. doi: 10.1016/j.toxcx.2020.100052.
- 173: Beaudry RI, Liang Y, Boyton ST, Tucker WJ, Brothers RM, Daniel KM, Rao R, Haykowsky MJ. Meta-analysis of Exercise Training on Vascular Endothelial Function in Cancer Survivors. *Integr Cancer Ther*. 2018 Jun;17(2):192-199. doi: 10.1177/1534735418756193.
- 174: Ahlskog JE. Aerobic Exercise: Evidence for a Direct Brain Effect to Slow Parkinson Disease Progression. *Mayo Clin Proc*. 2018 Mar;93(3):360-372. doi: 10.1016/j.mayocp.2017.12.015.
- 175: Yanai H, Adachi H, Masui Y, Katsuyama H, Kawaguchi A, Hakoshima M, Waragai Y, Harigae T, Hamasaki H, Sako A. Exercise Therapy for Patients With Type 2 Diabetes: A Narrative Review. *J Clin Med Res*. 2018 May;10(5):365-369. doi: 10.14740/jocmr3382w.
- 176: Senderovich H, Kosmopoulos A. An Insight into the Effect of Exercises on the Prevention of Osteoporosis and Associated Fractures in High-risk Individuals. *Rambam Maimonides Med J*. 2018 Jan 29;9(1):e0005. doi: 10.5041/RMMJ.10325.
- 177: Groot M, Lee H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells*. 2020 Apr 22;9(4):1044. doi: 10.3390/cells9041044.
- 178: Wang H, Xie Y, Salvador AM, Zhang Z, Chen K, Li G, Xiao J. Exosomes: Multifaceted Messengers in Atherosclerosis. *Curr Atheroscler Rep*. 2020 Aug 9;22(10):57. doi: 10.1007/s11883-020-00871-7.
- 179: Grange C, Skovronova R, Marabese F, Bussolati B. Stem Cell-Derived Extracellular Vesicles and Kidney Regeneration. *Cells*. 2019 Oct 11;8(10):1240. doi: 10.3390/cells8101240.
- 180: Bao C, He C. The role and therapeutic potential of MSC-derived exosomes in osteoarthritis. *Arch Biochem Biophys*. 2021 Oct 15;710:109002. doi: 10.1016/j.abb.2021.109002.
- 181: Huang Z, Xu A. Adipose Extracellular Vesicles in Intercellular and Inter- Organ Crosstalk in Metabolic Health and Diseases. *Front Immunol*. 2021 Feb 25;12:608680. doi: 10.3389/fimmu.2021.608680.
- 182: Chen JJ, Yang G, Yan QQ, Zhao J, Li S. Exosome-encapsulated microRNAs as promising biomarkers for Alzheimer's disease. *Rev Neurosci*. 2019 Dec 18;31(1):77-87. doi: 10.1515/revneuro-2019-0001.

183: Basthi Mohan P, Rajpurohit S, Musunuri B, Bhat G, Lochan R, Shetty S. Exosomes in chronic liver disease. Clin Chim Acta. 2023 Jan 2;540:117215. doi: 10.1016/j.cca.2022.117215.

184: Ströbel P, Hohenberger P, Marx A. Thymoma and thymic carcinoma: molecular pathology and targeted therapy. J Thorac Oncol. 2010 Oct;5(10 Suppl 4):S286-90. doi: 10.1097/JTO.0b013e-3181f209a8.

185: Board., W.C.o.T.E. Thoracic tumours. Lyon (France): International agency for research on cancer. In: WHO classification of tumours series, 5(5th ed (2021)).

186: Huang B, Belharazem D, Li L, Kneitz S, Schnabel PA, Rieker RJ, Körner D, Nix W, Schalke B, Müller-Hermelink HK, Ott G, Rosenwald A, Ströbel P, Marx A. Anti- Apoptotic Signature in Thymic Squamous Cell Carcinomas - Functional Relevance of Anti-Apoptotic BIRC3 Expression in the Thymic Carcinoma Cell Line 1889c. Front Oncol. 2013 Dec 31;3:316. doi: 10.3389/fonc.2013.00316.

187: Radovich M, Pickering CR, Felau I, Ha G, Zhang H, Jo H, Hoadley KA, Anur P, Zhang J, McLellan M, Bowlby R, Matthew T, Danilova L, Hegde AM, Kim J, Leiserson MDM, Sethi G, Lu C, Ryan M, Su X, Cherniack AD, Robertson G, Akbani R, Spellman P, Weinstein JN, Hayes DN, Raphael B, Lichtenberg T, Leraas K, Zenklusen JC; Cancer Genome Atlas Network; Fujimoto J, Scapulatempo-Neto C, Moreira AL, Hwang D, Huang J, Marino M, Korst R, Giaccone G, Gokmen-Polar Y, Badve S, Rajan A, Ströbel P, Girard N, Tsao MS, Marx A, Tsao AS, Loehrer PJ. The Integrated Genomic Landscape of Thymic Epithelial Tumors. Cancer Cell. 2018 Feb 12;33(2):244-258.e10. doi: 10.1016/j.ccell.2018.01.003.

188: Zhang X, Schalke B, Kvell K, Kriegsmann K, Kriegsmann M, Graeter T, Preissler G, Ott G, Kurz K, Bulut E, Ströbel P, Marx A, Belharazem D. WNT4 overexpression and secretion in thymic epithelial tumors drive an autocrine loop in tumor cells *in vitro*. Front Oncol. 2022 Jul 29;12:920871. doi: 10.3389/fonc.2022.920871.

189: Rodrigo B. Valenzuela. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPARs): Structure, Mechanisms of Action and Role in Health and Disease. Nova: Biochemistry, Biochemistry Research Trends. 2019. ISBN: 978-1-53614-737-7

190: Ali AT, Hochfeld WE, Myburgh R, Pepper MS. Adipocyte and adipogenesis. Eur J Cell Biol. 2013 Jun-Jul;92(6-7):229-36. doi: 10.1016/j.ejcb.2013.06.001.

191: Wani KA, Goswamy D, Taubert S, Ratnappan R, Ghazi A, Irazoqui JE. NHR-49/PPAR- $\alpha$  and HLH-30/TFEB cooperate for *C. elegans* host defense via a flavin-containing monooxygenase. Elife. 2021 May 12;10:e62775. doi: 10.7554/eLife.62775.

- 192: Jevtic S, Sengar AS, Salter MW, McLaurin J. The role of the immune system in Alzheimer disease: Etiology and treatment. *Ageing Res Rev.* 2017 Nov;40:84-94. doi: 10.1016/j.arr.2017.08.005.
- 193: Xie Z, Zhao J, Wang H, Jiang Y, Yang Q, Fu Y, Zeng H, Hölscher C, Xu J, Zhang Z. Magnolol alleviates Alzheimer's disease-like pathology in transgenic *C. elegans* by promoting microglia phagocytosis and the degradation of beta-amyloid through activation of PPAR- $\gamma$ . *Biomed Pharmacother.* 2020 Apr;124:109886. doi: 10.1016/j.biopha.2020.109886.
- 194: Christofides A, Konstantinidou E, Jani C, Boussiotis VA. The role of peroxisome proliferator-activated receptors (PPAR) in immune responses. *Metabolism.* 2021 Jan;114:154338. doi: 10.1016/j.metabol.2020.154338.
- 195: Huang G, Jiang W, Xie W, Lu W, Zhu W, Deng Z. Role of peroxisome proliferator-activated receptors in osteoarthritis (Review). *Mol Med Rep.* 2021 Feb;23(2):159. doi: 10.3892/mmr.2020.11798.
- 196: Billiet L, Furman C, Cuaz-Pérolin C, Paumelle R, Raymondjean M, Simmet T, Rouis M. Thioredoxin-1 and its natural inhibitor, vitamin D3 up-regulated protein 1, are differentially regulated by PPARalpha in human macrophages. *J Mol Biol.* 2008 Dec 19;384(3):564-76. doi: 10.1016/j.jmb.2008.09.061.
- 197: Lehmann M, Baarsma HA, Königshoff M. WNT Signaling in Lung Aging and Disease. *Ann Am Thorac Soc.* 2016 Dec;13 Suppl 5:S411-S416. doi: 10.1513/AnnalsATS.201608-586AW.
- 198: Chilosi M, Poletti V, Rossi A. The pathogenesis of COPD and IPF: distinct horns of the same devil? *Respir Res.* 2012 Jan 11;13(1):3. doi: 10.1186/1465-9921-13-3.
- 199: Jankowski JA, Bruton R, Shepherd N, Sanders DS. Cadherin and catenin biology represent a global mechanism for epithelial cancer progression. *Mol Pathol.* 1997 Dec;50(6):289-90. doi: 10.1136/mp.50.6.289.99:
- 200: Nwabo Kamdje AH, Seke Etet PF, Vecchio L, Muller JM, Krampera M, Lukong KE. Signaling pathways in breast cancer: therapeutic targeting of the microenvironment. *Cell Signal.* 2014 Dec;26(12):2843-56. doi: 10.1016/j.cellsig.2014.07.034.
- 201: Matly A, Quinn JA, McMillan DC, Park JH, Edwards J. The relationship between  $\beta$ -catenin and patient survival in colorectal cancer systematic review and meta-analysis. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2021 Jul;163:103337. doi: 10.1016/j.critrevonc.2021.103337. Epub 2021 May 13. PMID: 33992802.
- 202: Pfeiffer S, Vincent JP. Signalling at a distance: transport of Wingless in the embryonic epidermis of *Drosophila*. *Semin Cell Dev Biol.* 1999 Jun;10(3):303-9. doi: 10.1006/scdb.1999.0306.

- 203: Gradilla AC, Simon E, Aguilar G, Guerrero I. From intra- to extracellular vesicles: extracellular vesicles in developmental signalling. *Essays Biochem.* 2018 May 15;62(2):215-223. doi: 10.1042/EBC20180001.
- 204: David Rhodes: *Genetic Modification: Methods and Techniques*. Callisto Reference, 2017, ISBN: 978-1632398604
- 205: Lisa Diana Hill: *Genetic Modification*. Independent publisher, 2018, ISBN: 978-1790858187
- 206: Sarah Oliver: *Science and Technology of Genetic Modification and Biotechnology*. Independent publisher, 2022, ISBN: 979-8353057116
- 207: Szabo M, Czompoly T, Kvell K, Talaber G, Bartis D, Nemeth P, Berki T, Boldizsar F. Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells. *Int Immunol.* 2012 Feb;24(2):79-87. doi: 10.1093/intimm/dxr105.
- 208: Kvell K, Czömpöly T, Pikkarainen T, Balogh P. Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006 Mar 24;341(4):1193-202. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.01.083.
- 209: Friand V, David G, Zimmermann P. Syntenin and syndecan in the biogenesis of exosomes. *Biol Cell.* 2015 Oct;107(10):331-41. doi: 10.1111/boc.201500010.
- 210: Fais S, O'Driscoll L, Borrás FE, Buzas E, Camussi G, Cappello F, Carvalho J, Cordeiro da Silva A, Del Portillo H, El Andaloussi S, Ficko Trček T, Furlan R, Hendrix A, Gursel I, Kralj-Iglic V, Kaeffer B, Kosanovic M, Lekka ME, Lipps G, Logozzi M, Marcilla A, Sammar M, Llorente A, Nazarenko I, Oliveira C, Pocsfalvi G, Rajendran L, Raposo G, Rohde E, Siljander P, van Niel G, Vasconcelos MH, Yáñez-Mó M, Yliperttula ML, Zarovni N, Zavec AB, Giebel B. Evidence-Based Clinical Use of Nanoscale Extracellular Vesicles in Nanomedicine. *ACS Nano.* 2016 Apr 26;10(4):3886-99. doi: 10.1021/acsnano.5b08015.
- 211: Boon RA, Vickers KC. Intercellular transport of microRNAs. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2013 Feb;33(2):186-92. doi: 10.1161/ATVBAHA.112.300139.
- 212: Lu Y, Huang W, Li M, Zheng A. Exosome-Based Carrier for RNA Delivery: Progress and Challenges. *Pharmaceutics.* 2023 Feb 10;15(2):598. doi: 10.3390/pharmaceutics15020598.
- 213: Sadeghi S, Tehrani FR, Tahmasebi S, Shafiee A, Hashemi SM. Exosome engineering in cell therapy and drug delivery. *Inflammopharmacology.* 2023 Feb;31(1):145-169. doi: 10.1007/s10787-022-01115-7.



- 214: Li Z, Liu Z, Wu J, Li B. Cell-Derived Vesicles for mRNA Delivery. *Pharmaceutics*. 2022 Dec 2;14(12):2699. doi: 10.3390/pharmaceutics14122699.
- 215: Huang XC, Wu LB, Hsu JF, Shigeto S, Hsu HY. Biothiol-triggered, self- disassembled silica nanobeads for intracellular drug delivery. *Acta Biomater*. 2015 Sep;23:263-270. doi: 10.1016/j.act-bio.2015.05.006.
- 216: Rajpoot K. Solid Lipid Nanoparticles: A Promising Nanomaterial in Drug Delivery. *Curr Pharm Des*. 2019;25(37):3943-3959. doi: 10.2174/1381612825666190903155321.
- 217: Alavi M, Hamidi M. Passive and active targeting in cancer therapy by liposomes and lipid nanoparticles. *Drug Metab Pers Ther*. 2019 Feb 1;34(1). doi: 10.1515/dmpt-2018-0032.
- 218: Breitsamer M, Winter G. Vesicular phospholipid gels as drug delivery systems for small molecular weight drugs, peptides and proteins: State of the art review. *Int J Pharm*. 2019 Feb 25;557:1-8. doi: 10.1016/j.ijpharm.2018.12.030.
- 219: Cornelia Kasper and Martijn van Griensven. *Bioreactor System for Tissue Engineering*. Springer, 2010, ISBN: 978-3642160509
- 220: Carl-Fredrik Mandenius. *Bioreactors: Design, Operation and Novel Applications*. Wiley, 2016, ISBN: 978-3527337682
- 221: [https://3dbiotek.com/prod\\_3dbioreactor.aspx](https://3dbiotek.com/prod_3dbioreactor.aspx)
- 222: <https://www.sigmaaldrich.com/3dbiotek3dperfusionbioreactorsystemwithpump1234598765>
- 223: <https://ir.codiakbio.com>
- 224: <https://www.thermofisher.com/hu/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-instruments/quantstudio-systems/models/quantstudio-3d-digital.html>
- 225: Zhang Q, Pan Y, Ji J, Xu Y, Zhang Q, Qin L. Roles and action mechanisms of WNT4 in cell differentiation and human diseases: a review. *Cell Death Discov*. 2021 Oct 12;7(1):287. doi: 10.1038/s41420-021-00668-w.
- 226: Brack AS, Conboy MJ, Roy S, Lee M, Kuo CJ, Keller C, Rando TA. Increased Wnt signaling during aging alters muscle stem cell fate and increases fibrosis. *Science*. 2007 Aug 10;317(5839):807-10. doi: 10.1126/science.1144090.

227: Rauner M, Sipos W, Pietschmann P. Age-dependent Wnt gene expression in bone and during the course of osteoblast differentiation. *Age (Dordr)*. 2008 Dec;30(4):273-82. doi: 10.1007/s11357-008-9069-9.

228: Marchand A, Atassi F, Gaaya A, Leprince P, Le Feuvre C, Soubrier F, Lompré AM, Nadaud S. The Wnt/beta-catenin pathway is activated during advanced arterial aging in humans. *Aging Cell*. 2011 Apr;10(2):220-32. doi: 10.1111/j.1474-9726.2010.00661.x.

229: Inestrosa NC, Tapia-Rojas C, Lindsay CB, Zolezzi JM. Wnt Signaling Pathway Dysregulation in the Aging Brain: Lessons From the *Octodon degus*. *Front Cell Dev Biol*. 2020 Aug 5;8:734. doi: 10.3389/fcell.2020.00734.

230: Heudobler D, Rechenmacher M, Lüke F, Vogelhuber M, Pukrop T, Herr W, Ghibelli L, Gerner C, Reichle A. Peroxisome Proliferator-Activated Receptors (PPAR) $\gamma$  Agonists as Master Modulators of Tumor Tissue. *Int J Mol Sci*. 2018 Nov 9;19(11):3540. doi: 10.3390/ijms19113540.

231: Goode DK, Elgar G. The PAX258 gene subfamily: a comparative perspective. *Dev Dyn*. 2009 Dec;238(12):2951-74. doi: 10.1002/dvdy.22146.

232: Bauer DC, Buske FA, Bailey TL. Dual-functioning transcription factors in the developmental gene network of *Drosophila melanogaster*. *BMC Bioinformatics*. 2010 Jul 2;11:366. doi: 10.1186/1471-2105-11-366.

233: Boyle P, Després C. Dual-function transcription factors and their entourage: unique and unifying themes governing two pathogenesis-related genes. *Plant Signal Behav*. 2010 Jun;5(6):629-34. doi: 10.4161/psb.5.6.11570.

234: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Expert=2348](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Expert=2348)

235: [https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC\\_Exp.php?Lng=GB&Expert=79083](https://www.orpha.net/consor/cgi-bin/OC_Exp.php?Lng=GB&Expert=79083)

236: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/H34158>

237: Cai C, Gill R, Eum HA, Cao Z, Loughran PA, Darwiche S, Edmonds RD, Menzel CL, Biliar TR. Complement factor 3 deficiency attenuates hemorrhagic shock-related hepatic injury and systemic inflammatory response syndrome. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2010 Nov;299(5):R1175-82. doi: 10.1152/ajpregu.00282.2010.

238: Hansel TT, Kropshofer H, Singer T, Mitchell JA, George AJ. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Apr;9(4):325-38. doi: 10.1038/nrd3003.

239: <https://www.tamirna.com>

240: Rich AL. Epidemiology of thymoma. *J Thorac Dis.* 2020 Dec;12(12):7531-7535. doi: 10.21037/jtd-2019-thym-02.

241: Mirza AZ, Althagafi II, Shamshad H. Role of PPAR receptor in different diseases and their ligands: Physiological importance and clinical implications. *Eur J Med Chem.* 2019 Mar 15;166:502-513. doi: 10.1016/j.ejmech.2019.01.067.

242: <https://www.particle-works.com>

243: Zhang Y, Bi J, Huang J, Tang Y, Du S, Li P. Exosome: A Review of Its Classification, Isolation Techniques, Storage, Diagnostic and Targeted Therapy Applications. *Int J Nanomedicine.* 2020 Sep 22;15:6917-6934. doi: 10.2147/IJN.S264498.

244: Kimiz-Gebologlu I, Oncel SS. Exosomes: Large-scale production, isolation, drug loading efficiency, and biodistribution and uptake. *J Control Release.* 2022 Jul;347:533-543. doi: 10.1016/j.jconrel.2022.05.027.

245: Li YJ, Wu JY, Liu J, Xu W, Qiu X, Huang S, Hu XB, Xiang DX. Artificial exosomes for translational nanomedicine. *J Nanobiotechnology.* 2021 Aug 12;19(1):242. doi: 10.1186/s12951-021-00986-2.

246: Yue S, Zheng X, Zheng Y. Cell-type-specific role of lamin-B1 in thymus development and its inflammation-driven reduction in thymus aging. *Aging Cell.* 2019 Aug;18(4):e12952. doi: 10.1111/accel.12952.

247: González-Bermúdez B, Kobayashi H, Abarca-Ortega A, Córcoles-Lucas M, González-Sánchez M, De la Fuente M, Guinea GV, Elices M, Plaza GR. Aging is accompanied by T-cell stiffening and reduced interstitial migration through dysfunctional nuclear organization. *Immunology.* 2022 Dec;167(4):622-639. doi: 10.1111/imm.13559.

248: Yousefzadeh MJ, Zhao J, Bukata C, Wade EA, McGowan SJ, Angelini LA, Bank MP, Gurkar AU, McGuckian CA, Calubag MF, Kato JI, Burd CE, Robbins PD, Niedernhofer LJ. Tissue specificity of senescent cell accumulation during physiologic and accelerated aging of mice. *Aging Cell.* 2020 Mar;19(3):e13094. doi: 10.1111/accel.13094.

249: <https://digitalinsights.qiagen.com/products-overview/discovery-insights-portfolio/analysis-and-visualization/qiagen-ipa/>

kvell.krisztian\_95\_23

## **MELLÉKLETEK**

AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖZLEMÉNYEK

kvell.krisztian\_95\_23



## OPEN ACCESS

## EDITED BY

Paul Takam Kamga,  
Université Versailles Saint-  
Quentin-en-Yvelines,  
France

## REVIEWED BY

Hiroaki Toba,  
Tokushima University, Japan  
Agnese Po,  
Sapienza University of Rome,  
Italy

## \*CORRESPONDENCE

Djeda Belharazem  
djeda.belharazem@medma.uni-  
heidelberg.de

## SPECIALTY SECTION

This article was submitted to  
Thoracic Oncology,  
a section of the journal  
Frontiers in Oncology

RECEIVED 15 April 2022

ACCEPTED 01 July 2022

PUBLISHED 29 July 2022

## CITATION

Zhang X, Schalke B, Kvell K,  
Kriegsmann K, Kriegsmann M,  
Graeter T, Preissler G, Ott G, Kurz K,  
Bulut E, Ströbel P, Marx A and  
Belharazem D (2022) WNT4  
overexpression and secretion in  
thymic epithelial tumors drive  
an autocrine loop in  
tumor cells *in vitro*.  
*Front. Oncol.* 12:920871.  
doi: 10.3389/fonc.2022.920871

## COPYRIGHT

© 2022 Zhang, Schalke, Kvell,  
Kriegsmann, Kriegsmann, Graeter,  
Preissler, Ott, Kurz, Bulut, Ströbel, Marx  
and Belharazem. This is an open-access  
article distributed under the terms of  
the Creative Commons Attribution  
License (CC BY). The use, distribution  
or reproduction in other forums is  
permitted, provided the original author  
(s) and the copyright owner(s) are  
credited and that the original  
publication in this journal is cited, in  
accordance with accepted academic  
practice. No use, distribution or  
reproduction is permitted which does  
not comply with these terms.

# WNT4 overexpression and secretion in thymic epithelial tumors drive an autocrine loop in tumor cells *in vitro*

Xiaonan Zhang<sup>1</sup>, Berthold Schalke<sup>2</sup>, Krisztian Kvell<sup>3</sup>,  
Katharina Kriegsmann<sup>4</sup>, Mark Kriegsmann<sup>5,6</sup>, Thomas Graeter<sup>7</sup>,  
Gerhard Preissler<sup>8</sup>, German Ott<sup>9,10</sup>, Katrin Kurz<sup>9,10</sup>,  
Elena Bulut<sup>11</sup>, Philipp Ströbel<sup>12</sup>,  
Alexander Marx<sup>1</sup> and Djeda Belharazem<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Institute of Pathology and Medical Research Center, University Medical Centre Mannheim, University of Heidelberg, Mannheim, Germany, <sup>2</sup>Department of Neurology, University of Regensburg, Regensburg, Germany, <sup>3</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, Pecs, Hungary, <sup>4</sup>Department of Hematology, Oncology and Rheumatology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg, Germany, <sup>5</sup>Translational Lung Research Centre Heidelberg, German Centre for Lung Research, Heidelberg, Germany, <sup>6</sup>Institute of Pathology, University Hospital Heidelberg, Heidelberg University, Heidelberg, Germany, <sup>7</sup>Department of Thoracic Surgery, University Medical Centre Erlangen, Erlangen, Germany, <sup>8</sup>Department of Thoracic Surgery, Clinic Schillerhöhe, Robert-Bosch-Hospital, Gerlingen, Löwenstein, Germany, <sup>9</sup>Department of Clinical Pathology, Robert-Bosch-Hospital, Stuttgart, Germany, <sup>10</sup>Dr. Margarete Fischer-Bosch Institute for Clinical Pharmacology, Robert-Bosch-Hospital, Stuttgart, Germany, <sup>11</sup>Department of Thoracic Surgery, Thoraxklinik at Heidelberg University Hospital, Heidelberg, Germany, <sup>12</sup>Institute of Pathology, University Medical Center Göttingen, University of Göttingen, Göttingen, Germany

**Background:** WNT4-driven non-canonical signaling is crucial for homeostasis and age-related involution of the thymus. Abnormal WNT signaling is important in many cancers, but the role of WNT signaling in thymic tumors is largely unknown.

**Materials & Methods:** Expression and function of WNT4 and FZD6 were analyzed using qRT-PCR, Western blot, ELISA, in biopsies of non-neoplastic thymic (NT), thymoma and thymic carcinomas. ShRNA techniques and functional assays were used in primary thymic epithelial cells (pTECs) and TC cell line 1889c. Cells were conventionally (2D) grown and in three-dimensional (3D) spheroids.

**Results:** In biopsy, WHO classified B3 thymomas and TCs showed increased WNT4 expression compared with NTs. During short-term 2D culture, WNT4 expression and secretion declined in neoplastic pTECs but not in 3D spheroids or medium supplemented with recombinant WNT4 cultures. Under the latter condition, the growth of pTECs was accompanied by increased expression of non-canonical targets RAC1 and JNK. Down-regulation of WNT4 by shRNA induced cell death in pTECs derived from B3 thymomas and led to decreased RAC1, but not JNK protein phosphorylation. Pharmacological inhibition of NF- $\kappa$ B decreased both RAC1 and JNK phosphorylation in neoplastic pTECs.

kvell.krisztian\_95\_23





# Physical Activity as a Preventive Lifestyle Intervention Acts Through Specific Exosomal miRNA Species—Evidence From Human Short- and Long-Term Pilot Studies

Kitti Garai<sup>1,2</sup>, Zoltan Adam<sup>1,2</sup>, Robert Herczeg<sup>3</sup>, Krisztina Banfai<sup>1,2</sup>, Adam Gyebrovski<sup>4</sup>, Attila Gyenesei<sup>3</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2</sup>, Marta Wilhelm<sup>4</sup> and Krisztian Kvell<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>2</sup> Wnt-Signaling Research Group, Szentagothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>3</sup> Bioinformatics Research Group, Szentagothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>4</sup> Faculty of Science, Institute of Sport Sciences and Physical Education, University of Pécs, Pécs, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Martin Burtscher,  
University of Innsbruck, Austria

### Reviewed by:

Shamila D. Alipoor,  
National Institute for Genetic  
Engineering and Biotechnology, Iran  
Sigrun Lange,  
University of Westminster,  
United Kingdom

### \*Correspondence:

Krisztian Kvell  
kvell.krisztian@pte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Exercise Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 25 January 2021

**Accepted:** 12 July 2021

**Published:** 02 August 2021

### Citation:

Garai K, Adam Z, Herczeg R, Banfai K, Gyebrovski A, Gyenesei A, Pongracz JE, Wilhelm M and Kvell K (2021) Physical Activity as a Preventive Lifestyle Intervention Acts Through Specific Exosomal miRNA Species—Evidence From Human Short- and Long-Term Pilot Studies. *Front. Physiol.* 12:658218. doi: 10.3389/fphys.2021.658218




Exercise initiates systemic adaptation to promote health and prevent various lifestyle-related chronic diseases. Emerging evidence suggests that circulating exosomes mediate some of the beneficial effects of exercise via the transfer of microRNAs between tissues. Yet to date, a comprehensive profile of the exosomal miRNA (exomiR) content released following short-term (0.5 year in this study) and long-term (25 + years in this study) regular bouts of exercise is still lacking. However, a better understanding of these miRNA species would assist in clarifying the role of regular exercise at the molecular level in the prevention of chronic diseases. In the present pilot studies we analyzed serum exomiR expression in healthy young, sedentary participants ( $n = 14$ ; age:  $23 \pm 2$  years) at baseline and following a half year-long moderate-intensity regular exercise training. We also analyzed serum exomiR expression in older, healthy trained participants (seniors,  $n = 11$ ; age:  $62 \pm 6$  years) who engaged in endurance activities for at least 25 years. Following the isolation and enrichment of serum exosomes using Total Exosome Isolation Reagent (TEI) their exomiR levels were determined using the amplification-free Nanostring platform. Hierarchical cluster analysis revealed that the majority of exomiRs overlap for short-term (0.5 year in this study) and long-term (25 + years in this study) regular bouts of exercise. The top 12 significantly altered exomiRs (let-7a-5p; let-7g-5p; miR-130a-3p; miR-142-3p; miR-150-5p; miR-15a-5p; miR-15b-5p; miR-199a-3p; miR-199b-3p; miR-223-3p; miR-23a-3p, and miR-451a-3p) were used for further evaluation. According to KEGG pathway analysis a large portion of the exomiRs target chronic diseases including cancer, neurodegenerative and metabolic diseases, and viral infections. Our results provide evidence that exosomal miRNA modulation is the molecular mechanism through which regular exercise prevents various chronic diseases. The possibility of using such exomiRs to target diseases is of great interest. While further validation is needed, our comprehensive exomiR study presents, for the first time, the disease-preventive molecular pattern of both short and long-term regular exercise.

**Keywords:** regular exercise, exosome, miRNA, chronic disease, prevention

kvell.krisztian\_95\_23



# Effect of *Bitis gabonica* and *Dendroaspis angusticeps* snake venoms on apoptosis-related genes in human thymic epithelial cells

Francisc Boda<sup>1</sup> , Krisztina Banfai<sup>2,3</sup>, Kitti Garai<sup>2,3</sup>, Bela Kovacs<sup>1\*</sup> , Attila Almási<sup>4</sup>, Dalma Scheffer<sup>3,5</sup>, Reka Lambertne Sinkler<sup>3,5</sup>, Robert Csonka<sup>3,5</sup>, Tamas Czompoly<sup>3,5</sup>, Krisztian Kvell<sup>2,3</sup> 

<sup>1</sup>Department F1, Faculty of Pharmacy, George Emil Palade University of Medicine, Pharmacy, Science, and Technology of Targu Mures, Targu Mures, Romania.

<sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, Pecs, Hungary.

<sup>3</sup>Food Biotechnology Research Group, Szentagotai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary.

<sup>4</sup>Department of Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, Pecs, Hungary.

<sup>5</sup>Soft Flow Ltd., Pecs, Hungary.

## Abstract

**Background:** Certain environmental toxins permanently damage the thymic epithelium, accelerate immune senescence and trigger secondary immune pathologies. However, the exact underlying cellular mechanisms and pathways of permanent immune intoxication remain unknown. The aim of the present study was to demonstrate gene expressional changes of apoptosis-related cellular pathways in human thymic epithelial cells following exposure to snake venom from *Bitis gabonica* and *Dendroaspis angusticeps*.

**Methods:** Snake venoms were characterized by analytical methods including reversed phase high-performance liquid chromatography and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis, then applied on human thymic epithelial cells (1889c) for 24 h at 10 µg/mL (as used in previous TaqMan Array study). Gene expressional changes restricted to apoptosis were assayed by TaqMan Array (Human Apoptosis Plate).

**Results:** The most prominent gene expressional changes were shown by *CASP5* (≈ 2.5 million-fold, confirmed by dedicated quantitative polymerase chain reaction) and *CARD9* (0.016-fold) for *B. gabonica*, and *BIRC7* (6.46-fold) and *CASP1* (0.30-fold) for *D. angusticeps*.

**Conclusion:** The observed apoptotic environment suggests that pyroptosis may be the dominant pathway through which *B. gabonica* and *D. angusticeps* snake venoms trigger thymic epithelial apoptosis following envenomation.

## Keywords:

Snake venoms

*Bitis gabonica*

*Dendroaspis angusticeps*

Apoptosis

Pyroptosis

Apoptosis mediators

RT-qPCR

Taqman array

\* **Correspondence:** [bela.kovacs@umfst.ro](mailto:bela.kovacs@umfst.ro)

<https://doi.org/10.1590/1678-9199-JVATITD-2020-0057>

Received: 18 April 2020; Accepted: 23 September 2020; Published online: 14 December 2020



On-line ISSN 1678-9199 © The Author(s), 2020 Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

kvell.krisztian\_95\_23



# Artificial Neural Network Correlation and Biostatistics Evaluation of Physiological and Molecular Parameters in Healthy Young Individuals Performing Regular Exercise

Kitti Garai<sup>1,2</sup>, Zoltan Adam<sup>1,2</sup>, Robert Herczeg<sup>3</sup>, Emese Katai<sup>2,4</sup>, Tamas Nagy<sup>2,4</sup>, Szilard Pal<sup>5</sup>, Attila Gyenesei<sup>3</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2</sup>, Marta Wilhelm<sup>6\*</sup> and Krisztian Kvell<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>2</sup> Wnt Signaling Research Group, Szentagothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>3</sup> Bioinformatics Research Group, Szentagothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>4</sup> Department of Laboratory Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>5</sup> Department of Pharmaceutical Technology and Biopharmacy, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>6</sup> Faculty of Science, Institute of Sport Sciences and Physical Education, University of Pécs, Pécs, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Giuseppe D'Antona,  
University of Pavia, Italy

### Reviewed by:

Garry Kuan,  
Universiti Sains Malaysia, Malaysia  
Ildiko Bock-Marquette,  
University of Pécs, Hungary

### \*Correspondence:

Marta Wilhelm  
mwilhelm@gamma.ttk.pte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Exercise Physiology,  
a section of the journal  
Frontiers in Physiology

**Received:** 17 December 2018

**Accepted:** 10 September 2019

**Published:** 02 October 2019

### Citation:

Garai K, Adam Z, Herczeg R, Katai E, Nagy T, Pal S, Gyenesei A, Pongracz JE, Wilhelm M and Kvell K (2019) Artificial Neural Network Correlation and Biostatistics Evaluation of Physiological and Molecular Parameters in Healthy Young Individuals Performing Regular Exercise. *Front. Physiol.* 10:1242. doi: 10.3389/fphys.2019.01242




Studies support that regular physical activity (PA) decelerates senescence-related decline of physiological and molecular parameters in the elderly. We have addressed the other end of this spectrum: healthy and young, inactive individuals participated in a 6-month long personal trainer-guided lifestyle program. We have measured physiological and molecular parameters (differentiating high- and low responders) and their correlation with PA (sedentary status). Cluster analysis helped to distinguish individuals with high- or low PA and differentiate high- and low-responders of each parameter. The assessed cardiovascular parameters (heart rate, blood pressure, 6-min walking distance, relative VO<sub>2</sub>max), body composition parameters (body fat and muscle mass percentage) metabolic parameters (glucose, insulin, HDL, LDL), immune parameters (cortisol, CRP, lymphocyte counts, hTREC) all showed improvement. Artificial neural network analysis (ANN) showed correlation efficiencies of physiological and molecular parameters using a concept-free approach. ANN analysis appointed PA as the mastermind of molecular level changes. Besides sedentary status, insulin and hTREC showed significant segregation. Biostatistics evaluation also supported the schism of participants for their sedentary status, insulin concentration and hTREC copy number. In the future ANN and biostatistics, may predict individual responses to regular exercise. Our program reveals that high responder individuals of certain parameters may be low responders of others. Our data show that moderate regular PA is essential to counteract senescence in young and healthy individuals, despite individual differences in responsiveness. Such PA may not seem important in the everyday life of young and healthy adults, but shall become the base for healthy aging.

**Keywords:** aging, physical activity, responsiveness, prediction, prevention

kvell.krisztian\_95\_23

Article

# Analysis of Tks4 Knockout Mice Suggests a Role for Tks4 in Adipose Tissue Homeostasis in the Context of Beigeing

Virag Vas <sup>1,\*</sup> , Tamás Háhner <sup>1</sup>, Gyöngyi Kudlik <sup>1</sup> , Dávid Ernst <sup>2</sup>, Krisztián Kvell <sup>3</sup>, Dániel Kuti <sup>4</sup>, Krisztina J. Kovács <sup>4</sup>, József Tóvári <sup>5</sup>, Mária Trexler <sup>1</sup>, Balázs L. Merő <sup>1</sup>, Bálint Szeder <sup>1</sup>, Kitti Koprivanacz <sup>1</sup> and László Buday <sup>1,6</sup> 

<sup>1</sup> Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, 1117 Budapest, Hungary

<sup>2</sup> Institute of Physiology, Medical School University of Pécs, 7622 Pécs, Hungary

<sup>3</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy and Szentagothai Research Center University of Pécs, 7622 Pécs, Hungary

<sup>4</sup> Laboratory of Molecular Neuroendocrinology, Institute of Experimental Medicine, 1083 Budapest, Hungary

<sup>5</sup> Department of Experimental Pharmacology, National Institute of Oncology, 1122 Budapest, Hungary

<sup>6</sup> Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Medical School, 1094 Budapest, Hungary

\* Correspondence: vas.virag@ttk.mta.hu; Tel.: +36-20-210-0880

Received: 17 May 2019; Accepted: 30 July 2019; Published: 5 August 2019



**Abstract:** Obesity and adipocyte malfunction are related to and arise as consequences of disturbances in signaling pathways. Tyrosine kinase substrate with four Src homology 3 domains (Tks4) is a scaffold protein that establishes a platform for signaling cascade molecules during podosome formation and epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling. Several lines of evidence have also suggested that Tks4 has a role in adipocyte biology; however, its roles in the various types of adipocytes at the cellular level and in transcriptional regulation have not been studied. Therefore, we hypothesized that Tks4 functions as an organizing molecule in signaling networks that regulate adipocyte homeostasis. Our aims were to study the white and brown adipose depots of Tks4 knockout (KO) mice using immunohistology and western blotting and to analyze gene expression changes regulated by the white, brown, and beige adipocyte-related transcription factors via a PCR array. Based on morphological differences in the Tks4-KO adipocytes and increased uncoupling protein 1 (UCP1) expression in the white adipose tissue (WAT) of Tks4-KO mice, we concluded that the beigeing process was more robust in the WAT of Tks4-KO mice compared to the wild-type animals. Furthermore, in the Tks4-KO WAT, the expression profile of peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )-regulated adipogenesis-related genes was shifted in favor of the appearance of beige-like cells. These results suggest that Tks4 and its downstream signaling partners are novel regulators of adipocyte functions and PPAR $\gamma$ -directed white to beige adipose tissue conversion.

**Keywords:** WAT browning; beige adipocytes; adipogenesis; Tks4 scaffold protein

## 1. Introduction

Obesity and obesity-related diseases are becoming increasingly common, and while the obesity-inducing effects of physical inactivity and poor eating habits are well known, other factors that contribute to the development of obesity and obesity-associated conditions are less clear [1]. Therefore, the molecular and genetic mechanisms governing obesity are intensively studied, with the goal of improving the management and treatment of obesity-associated diseases [2–4]. Such studies have identified numerous biochemical factors that control fat storage [5–7] and differences in

kvell.krisztian\_95\_23





# “Beige” Cross Talk Between the Immune System and Metabolism

Krisztina Banfai<sup>1,2</sup>, David Ernszt<sup>2,3</sup>, Attila Pap<sup>4</sup>, Peter Bai<sup>5,6,7,8</sup>, Kitti Garai<sup>1,2</sup>, Djeda Belharazem<sup>9</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2</sup> and Krisztian Kvell<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>2</sup> Szentagothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>3</sup> Department of Physiology, Medical School, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>4</sup> Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>5</sup> Medical Chemistry, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>6</sup> MTA-DE Cell Biology and Signaling Research Group, Debrecen, Hungary, <sup>7</sup> MTA-DE Lendulet Laboratory of Cellular Metabolism, Debrecen, Hungary, <sup>8</sup> Research Center for Molecular Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>9</sup> Department of Pathology, University Hospital of Mannheim, Mannheim, Germany

With thymic senescence the epithelial network shrinks to be replaced by adipose tissue. Transcription factor TBX-1 controls thymus organogenesis, however, the same TBX-1 has also been reported to orchestrate beige adipose tissue development. Given these different roles of TBX-1, we have assessed if thymic TBX-1 expression persists and demonstrates this dualism during adulthood. We have also checked whether thymic adipose involution could yield beige adipose tissue. We have used adult mouse and human thymus tissue from various ages to evaluate the kinetics of TBX-1 expression, as well as mouse (TEP1) and human (1889c) thymic epithelial cells (TECs) for our studies. Electron micrographs show multi-locular lipid deposits typical of beige adipose cells. Histology staining shows the accumulation of neutral lipid deposits. qPCR measurements show persistent and/or elevating levels of beige-specific and beige-indicative markers (TBX-1, EAR-2, UCP-1, PPAR-gamma). We have performed miRNome profiling using qPCR-based QuantStudio platform and amplification-free NanoString platform. We have observed characteristic alterations, including increased miR21 level (promoting adipose tissue development) and decreased miR34a level (bias toward beige adipose tissue differentiation). Finally, using the Seahorse metabolic platform we have recorded a metabolic profile (OCR/ECAR ratio) indicative of beige adipose tissue. In summary, our results support that thymic adipose tissue emerging with senescence is *bona fide* beige adipose tissue. Our data show how the borders blur between a key immune tissue (the thymus) and a key metabolic tissue (beige adipose tissue) with senescence. Our work contributes to the understanding of cross talk between the immune system and metabolism.

**Keywords:** thymus senescence, beige adipose tissue, TBX-1, UCP-1, PPARgamma

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Jie Chen,  
Xiamen University, China

### Reviewed by:

Luis Tort,  
Autonomous University of  
Barcelona, Spain  
Mark Klitgaard Nohr,  
University of Copenhagen, Denmark

### \*Correspondence:

Krisztian Kvell  
kvell.krisztian@pte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Experimental Endocrinology,  
a section of the journal  
Frontiers in Endocrinology

**Received:** 11 March 2019

**Accepted:** 24 May 2019

**Published:** 18 June 2019

### Citation:

Banfai K, Ernszt D, Pap A, Bai P,  
Garai K, Belharazem D, Pongracz JE  
and Kvell K (2019) “Beige” Cross Talk  
Between the Immune System and  
Metabolism.  
Front. Endocrinol. 10:369.  
doi: 10.3389/fendo.2019.00369

## INTRODUCTION

In human the degenerative process of thymic adipose involution is already detectable in childhood and accelerates with puberty due to hormonal (sex-steroid) induction (1–3). The process shows identical kinetics in mouse. Also, we have developed a model whereby TECs are treated by a steroid (using Dx or dexamethasone) thus both *in vivo* and *in vitro* model systems are readily available (4) As for all adipose tissues subtypes, thymic adipose involution is orchestrated by transcription

kvell.krisztian\_95\_23



# Transgenic Exosomes for Thymus Regeneration

Krisztina Banfai<sup>1,2</sup>, Kitti Garai<sup>1,2</sup>, David Ernszt<sup>2,3</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2</sup> and Krisztian Kvell<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>2</sup> Szentagothai Research Center, University of Pécs, Pécs, Hungary, <sup>3</sup> Faculty of Medicine, Institute of Physiology, University of Pécs, Pécs, Hungary

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Denise Doolan,  
James Cook University, Australia

### Reviewed by:

Axel T. Lehrer,  
University of Hawaii at Manoa,  
United States  
Csaba Vizler,  
Hungarian Academy of Sciences,  
Hungary

### \*Correspondence:

Krisztian Kvell  
kvell.krisztian@pte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Vaccines and Molecular Therapeutics,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 06 July 2018

**Accepted:** 04 April 2019

**Published:** 24 April 2019

### Citation:

Banfai K, Garai K, Ernszt D,  
Pongracz JE and Kvell K (2019)  
Transgenic Exosomes for Thymus  
Regeneration.  
Front. Immunol. 10:862.  
doi: 10.3389/fimmu.2019.00862

During senescence, Wnt4 expression is down-regulated (unlike their Frizzled receptors), while PPARgamma expression increases in the thymus. Together, these changes allow for thymic degeneration to occur, observed as adipose involution. However, when restored, Wnt4 can efficiently counteract PPARgamma and prevent thymic senescence from developing. The Wnt-pathway activator miR27b has also been reported to inhibit PPARgamma. Our goal was to evaluate the Wnt4 and miR27b levels of Wnt4-transgenic thymic epithelial cell (TEC)-derived exosomes, show their regenerative potential against age-related thymic degeneration, and visualize their binding and distribution both *in vitro* and *in vivo*. First, transgenic exosomes were harvested from Wnt4 over-expressing TECs and analyzed by transmission electron microscopy. This unveiled exosomes ranging from 50 to 100 nm in size. Exosomal Wnt4 protein content was assayed by ELISA, while miR27b levels were measured by TaqMan qPCR, both showing elevated levels in transgenic exosomes relative to controls. Of note, kit-purified TEI (total exosome isolate) outperformed UC (ultracentrifugation)-purified exosomes in these parameters. In addition, a significant portion of exosomal Wnt4 proved to be displayed on exosomal surfaces. For functional studies, steroid (Dexamethasone or DX)-induced TECs were used as cellular aging models in which DX-triggered cellular aging was efficiently prevented by transgenic exosomes. Finally, Dil lipid-stained exosomes were applied on the mouse thymus sections and also iv-injected into mice, for *in vitro* binding and *in vivo* tracking, respectively. We have observed distinct staining patterns using Dil lipid-stained transgenic exosomes on sections of young and aging murine thymus samples. Moreover, *in vivo* injected Dil lipid-stained transgenic exosomes showed detectable homing to the thymus. Of note, Wnt4-transgenic exosome homing outperformed control (Wnt5a-transgenic) exosome homing. In summary, our findings indicate that exosomal Wnt4 and miR27b can efficiently counteract thymic adipose involution. Although extrapolation of mouse results to the human setting needs caution, our results appoint transgenic TEC exosomes as promising tools of immune rejuvenation and contribute to the characterization of the immune-modulatory effects of extracellular vesicles in the context of regenerative medicine.

**Keywords:** aging, thymus, exosome, Wnt4, miR27b

kvell.krisztian\_95\_23



Article

# Effect of *Vipera ammodytes ammodytes* Snake Venom on the Human Cytokine Network

Francisc Boda <sup>1</sup> , Krisztina Banfai <sup>2,3</sup>, Kitti Garai <sup>2,3</sup>, Augustin Curticapean <sup>1</sup> ,  
Lavinia Berta <sup>1,\*</sup> , Emese Sipos <sup>4</sup> and Krisztian Kvell <sup>2,3</sup>

<sup>1</sup> Department of Fundamental Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy of Tirgu Mures, Gheorghe Marinescu Street No. 38, 540139 Tirgu Mures, Romania; boda.francisc@umftgm.ro (F.B.); augustin.curticapean@umftgm.ro (A.C.)

<sup>2</sup> Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, Rokus Street No. 2, 7624 Pecs, Hungary; krisztina.banfai@aok.pte.hu (K.B.); garai.kitti91@gmail.com (K.G.); kvell.krisztian@pte.hu (K.K.)

<sup>3</sup> Szentagothai Research Center, University of Pecs, Ifjusag Street No. 20, 7624 Pecs, Hungary

<sup>4</sup> Department of Specialty Pharmaceutical Sciences, Faculty of Pharmacy, University of Medicine and Pharmacy of Tirgu Mures, Gheorghe Marinescu Street No. 38, 540139 Tirgu Mures, Romania; emese.sipos@umftgm.ro

\* Correspondence: grama.lavinia@umftgm.ro; Tel.: +40-740-694-638

Received: 11 June 2018; Accepted: 21 June 2018; Published: 25 June 2018



**Abstract:** Local inflammation is a well-known symptom of envenomation by snakes of the family *Viperidae*, attributed primarily to the phospholipase A<sub>2</sub>s, metalloproteinases and L-amino acid oxidases contained in their venom. The inflammatory effect of snake venoms has been associated with a marked increase of the cytokines IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 and TNF- $\alpha$ . To determine the impact of *Vipera ammodytes ammodytes* snake venom on the expression of inflammation-related genes, we incubated human U937 monocyte cells with dilutions of snake venom. Gene expression was quantified for 28 different genes using a TaqMan<sup>®</sup> Array Human Cytokine Network 96-well Plate in a RT-qPCR system. Our results have demonstrated that 1.0  $\mu$ g/mL *Vipera ammodytes ammodytes* venom solution induces a notable change in the expression of several cytokine network genes. Among the upregulated genes, there were several that encode interleukins, interferons, and tumor necrosis factors. We further report the downregulation of three interleukin-related genes. Our findings come as supportive information for the known complex effect of snake venoms on the human cytokine network. It also provides relevant new information regarding the expression of genes that have not been previously associated with the effect of snake venoms.

**Keywords:** snake venoms; *Vipera ammodytes*; inflammation-related genes; inflammatory mediators; cytokines; RT-qPCR

**Key Contribution:** We present a Taqman Array method to simultaneously determine the effect of *Vipera ammodytes ammodytes* snake venom on 28 inflammation-related genes. The results show that the venom alters the expression of several cytokine network genes, including genes not yet associated with the effect of snake venoms.

## 1. Introduction

The inflammatory process represents a defense mechanism of the body against harmful pathogens, damaged cells, or irritating substances. Inflammation can take an acute or chronic form. In its acute form, five typical signs of inflammation are usually present: heat, pain, redness, swelling, and loss of function of the affected tissues or organs. Chronic inflammatory processes are characterized by a

kvell.krisztian\_95\_23



# PPARgamma Deficiency Counteracts Thymic Senescence

David Ernszt<sup>1,2</sup>, Krisztina Banfai<sup>1,2</sup>, Zoltan Kellermayer<sup>3</sup>, Attila Pap<sup>4</sup>, Janet M. Lord<sup>5</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2</sup> and Krisztian Kvell<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup>Faculty of Pharmacy, Department of Pharmaceutical Biotechnology, University of Pecs, Pecs, Hungary, <sup>2</sup>Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary, <sup>3</sup>Faculty of Medicine, Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Pecs, Hungary, <sup>4</sup>Faculty of Medicine, Department of Biochemistry and Molecular Biology, University of Debrecen, Debrecen, Hungary, <sup>5</sup>College of Medical and Dental Sciences, Institute of Inflammation and Aging, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

## OPEN ACCESS

### Edited by:

Duncan Howie,  
University of Oxford,  
United Kingdom

### Reviewed by:

Susan Mariola Schlenner,  
KU Leuven, Belgium  
Juei-Tang Cheng,  
Chang Jung Christian  
University, Taiwan

### \*Correspondence:

Krisztian Kvell  
kvell.krisztian@pte.hu

### Specialty section:

This article was submitted to  
Immunological Tolerance  
and Regulation,  
a section of the journal  
Frontiers in Immunology

**Received:** 28 July 2017

**Accepted:** 26 October 2017

**Published:** 06 November 2017

### Citation:

Ernszt D, Banfai K, Kellermayer Z,  
Pap A, Lord JM, Pongracz JE and  
Kvell K (2017) PPARgamma  
Deficiency Counteracts  
Thymic Senescence.  
Front. Immunol. 8:1515.  
doi: 10.3389/fimmu.2017.01515

Thymic senescence contributes to increased incidence of infection, cancer and autoimmunity at senior ages. This process manifests as adipose involution. As with other adipose tissues, thymic adipose involution is also controlled by PPARgamma. This is supported by observations reporting that systemic PPARgamma activation accelerates thymic adipose involution. Therefore, we hypothesized that decreased PPARgamma activity could prevent thymic adipose involution, although it may trigger metabolic adverse effects. We have confirmed that both human and murine thymic sections show marked staining for PPARgamma at senior ages. We have also tested the thymic lobes of PPARgamma haplo-insufficient and null mice. Supporting our working hypothesis both adult PPARgamma haplo-insufficient and null mice show delayed thymic senescence by thymus histology, thymocyte mouse T-cell recombination excision circle qPCR and peripheral blood naive T-cell ratio by flow-cytometry. Delayed senescence showed dose-response with respect to PPARgamma deficiency. Functional immune parameters were also evaluated at senior ages in PPARgamma haplo-insufficient mice (null mice do not reach senior ages due to metabolic adverse affects). As expected, sustained and elevated T-cell production conferred oral tolerance and enhanced vaccination efficiency in senior PPARgamma haplo-insufficient, but not in senior wild-type littermates according to ELISA IgG measurements. Of note, humans also show increased oral intolerance issues and decreased protection by vaccines at senior ages. Moreover, PPARgamma haplo-insufficiency also exists in human known as a rare disease (FPLD3) causing metabolic adverse effects, similar to the mouse. When compared to age- and metabolic disorder-matched other patient samples (FPLD2 not affecting PPARgamma activity), FPLD3 patients showed increased human Trec (hTrec) values by qPCR (within healthy human range) suggesting delayed thymic senescence, in accordance with mouse results and supporting our working hypothesis. In summary, our experiments prove that systemic decrease of PPARgamma activity prevents thymic senescence, albeit with metabolic drawbacks. However, thymic tissue-specific PPARgamma antagonism would likely solve the issue.

**Keywords:** PPARgamma, thymus, immunity, senescence, rejuvenation

kvell.krisztian\_95\_23



## REVIEW

## Open Access



# WNT signaling – lung cancer is no exception

Judit Rapp<sup>1,2</sup>, Luca Jaromi<sup>1,2</sup>, Krisztian Kvell<sup>1,2</sup>, Gyorgy Miskei<sup>1,2</sup> and Judit E. Pongracz<sup>1,2\*</sup>**Abstract**

Since the initial discovery of the oncogenic activity of WNT ligands our understanding of the complex roles for WNT signaling pathways in lung cancers has increased substantially. In the current review, the various effects of activation and inhibition of the WNT signaling pathways are summarized in the context of lung carcinogenesis. Recent evidence regarding WNT ligand transport mechanisms, the role of WNT signaling in lung cancer angiogenesis and drug transporter regulation and the importance of microRNA and posttranscriptional regulation of WNT signaling are also reviewed.

**Background**

Lung cancer (LC) is one of the deadliest forms of cancer worldwide [1, 2] affecting both genders [3, 4]. The two main types of LC-s are small cell lung cancer (SCLC) and non-small cell lung cancer (NSCLC). SCLC represents 15–20% of all LC cases and is the more aggressive form; it metastasizes early and therefore surgical intervention is rarely a therapeutic option [5]. On the other hand, NSCLC denotes 80–85% and can be further classified into adeno (AC)-, squamous cell (SCC) -, large cell (LCC) and various mixed type carcinomas [6]. Unfortunately, the majority of NSCLC patients are diagnosed at an advanced stage of the disease narrowing down therapeutic options and leading to a limited median survival of about 18 months [7]. Recent studies have confirmed that therapy-surviving cancer stem cells (CSC) play a cardinal role in drug resistance and therefore, rapid progression of the disease [8]. While the carcinogenic process in the lung can be traced back to genetic mutations, malfunctioning signaling pathways are also highly important modulators of tumor formation and individual features of the disease.

An increasing amount of evidence has shown that the WNT pathway is one of the main signaling pathways involved in maintaining lung homeostasis and that aberrant activation of this pathway may underlie several debilitating lung diseases. Similarly, to other human cancers, WNT

signaling plays an important part in lung carcinogenesis. Interestingly, however, while some epigenetic changes that affect WNT pathway inhibitors are similar to those seen in other malignancies, genetic mutations of the WNT pathway are uncommon in NSCLCs [9].

This review will summarize some novel aspects of WNT signaling, what is currently known about WNT associated LC pathogenesis as well as some important features of WNT mediated events in LC therapies.

**The complexity of WNT signaling – Canonical and non-canonical WNT signaling pathways**

WNT proteins are secreted glyco-lipoprotein morphogens that are required during lung development for cell-fate specification, cell proliferation and the control of asymmetric cell division. In adults, WNT signaling is essential for stem cell maintenance for regulation of tissue homeostasis [10]. Most of the 19 WNT ligands and the 10 main receptors, Frizzleds (FZD) that have been identified in mammalian cells can be identified in the human lung [9, 11]. The two main different WNT pathways include i) the beta-catenin-dependent or canonical pathway, and ii) the beta-catenin-independent or non-canonical pathways including the planar cell polarity (PCP) and the WNT/Ca<sup>2+</sup> pathways (Fig. 1).

**Canonical or beta-catenin dependent WNT signaling.**

In the lung, the role of WNT signaling has been examined in detail by multiple studies which mostly focus on beta-catenin-dependent signaling. In the canonical pathway during the absence of WNT, a beta-catenin destruction

\* Correspondence: pongracz.ejudit@pte.hu

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, University of Pecs, Pecs, Hungary

<sup>2</sup>Szentagothai Research Centre, University of Pecs, Pecs, Hungary



kvell.krisztian\_95\_23

# SCIENTIFIC REPORTS



OPEN

## The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages

Received: 26 May 2016  
Accepted: 08 September 2016  
Published: 06 October 2016

Metta Dülk<sup>1,\*</sup>, Gyöngyi Kudlik<sup>1,\*</sup>, Anna Fekete<sup>1</sup>, Dávid Ernszt<sup>2,3</sup>, Krisztián Kvell<sup>2,3</sup>, Judit E. Pongrácz<sup>2,3</sup>, Balázs L. Merő<sup>1</sup>, Bálint Szeder<sup>1</sup>, László Radnai<sup>1</sup>, Miklós Geiszt<sup>4,5</sup>, Dalma E. Csécsy<sup>1</sup>, Tamás Kovács<sup>1</sup>, Ferenc Uher<sup>6</sup>, Árpád Lányi<sup>7</sup>, Virag Vas<sup>1</sup> & László Buday<sup>1,8</sup>

The commitment steps of mesenchymal stromal cells (MSCs) to adipogenic and other lineages have been widely studied but not fully understood. Therefore, it is critical to understand which molecules contribute to the conversion of stem cells into differentiated cells. The scaffold protein Tks4 plays a role in podosome formation, EGFR signaling and ROS production. Dysfunction of Tks4 causes a hereditary disease called Frank-ter Haar syndrome with a variety of defects concerning certain mesenchymal tissues (bone, fat and cartilage) throughout embryogenic and postnatal development. In this study, we aimed to analyze how the mutation of Tks4 affects the differentiation potential of multipotent bone marrow MSCs (BM-MSCs). We generated a Tks4 knock-out mouse strain on C57Bl/6 background, and characterized BM-MSCs isolated from wild type and Tks4<sup>-/-</sup> mice to evaluate their differentiation. Tks4<sup>-/-</sup> BM-MSCs had reduced ability to differentiate into osteogenic and adipogenic lineages compared to wild type. Studying the expression profile of a panel of lipid-regulated genes during adipogenic induction revealed that the expression of adipogenic transcription factors, genes responsible for lipid droplet formation, sterol and fatty acid metabolism was delayed or reduced in Tks4<sup>-/-</sup> BM-MSCs. Taken together, these results establish a novel function for Tks4 in the regulation of MSC differentiation.

Frank-ter Haar syndrome (FTHS, OMIM:249420), is a rare genetic disorder associated with skeletal defects, craniofacial anomalies, cardiovascular abnormalities and, in some cases, reduced lipid tissue<sup>1,2</sup>. The majority of FTHS patients die in infancy or in early childhood due to cardiovascular symptoms or respiratory infections<sup>3</sup>. The most common underlying genetic defects in FTHS have been recently identified through homozygosity mapping studies in patients, identifying homozygous mutations in the *SH3PXD2B* gene on chromosome 5q35.1<sup>3</sup>. The analysis of patients detected 4 different intragenic mutations, and one complete deletion of *SH3PXD2B*<sup>3</sup>. A novel mutation in FTHS patients has also been described as the deletion of exon 13 of the *SH3PXD2B* gene<sup>4</sup>. Recently, two new homozygous loss-of-function mutations were identified in the *SH3PXD2B* gene in patients with Borrone dermato-cardio-skeletal syndrome (BDSC syndrome) which is a FTHS related genetic disease<sup>5</sup>.

<sup>1</sup>Institute of Enzymology, Research Centre for Natural Sciences, Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary. <sup>2</sup>Department of Pharmaceutical Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Pecs, Hungary. <sup>3</sup>Szentagothai Research Center, University of Pecs, Hungary. <sup>4</sup>Department of Physiology, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary. <sup>5</sup>"Momentum" Peroxidase Enzyme Research Group of the Semmelweis University and the Hungarian Academy of Sciences, Budapest, Hungary. <sup>6</sup>Stem Cell Biology, National Blood Service, Budapest, Hungary. <sup>7</sup>Department of Immunology, Faculty of Medicine, University of Debrecen, Debrecen, Hungary. <sup>8</sup>Department of Medical Chemistry, Semmelweis University Medical School, Budapest, Hungary. \*These authors contributed equally to this work. Correspondence and requests for materials should be addressed to V.V. (email: vas.virag@ttk.mta.hu)

kvell.krisztian\_95\_23

## RESEARCH ARTICLE

# Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis

Izabella Solti<sup>1</sup>✉, Krisztian Kvell<sup>2</sup>✉, Gergely Talaber<sup>3</sup>, Sara Veto<sup>1</sup>, Peter Acs<sup>4</sup>, Ferenc Gallyas, Jr.<sup>1,5,6</sup>, Zsolt Illes<sup>7</sup>, Katalin Fekete<sup>1</sup>, Petra Zalan<sup>1</sup>, Arpad Szanto<sup>8</sup>, Zita Bogнар<sup>1</sup>\*

**1** Department of Biochemistry and Medical Chemistry, University of Pecs, Pecs, Hungary, **2** Department of Pharmaceutical Biotechnology, University of Pecs, Pecs, Hungary, **3** Karolinska Institutet, Department of Biosciences and Nutrition, NOVUM, Huddinge, Sweden, **4** Department of Neurology, University of Pecs, Pecs, Hungary, **5** MTA-PTE Nuclear-Mitochondrial Research Group, Pecs, Hungary, **6** Szentagothai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary, **7** Department of Neurology, Odense University Hospital, Institute of Clinical Research, University of Southern Denmark, Odense, Denmark, **8** Department of Urology, University of Pecs, Pecs, Hungary

✉ These authors contributed equally to this work.

\* [zita.bognar@aok.pte.hu](mailto:zita.bognar@aok.pte.hu)



CrossMark  
click for updates

## OPEN ACCESS

**Citation:** Solti I, Kvell K, Talaber G, Veto S, Acs P, Gallyas F, Jr., et al. (2015) Thymic Atrophy and Apoptosis of CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> Thymocytes in the Cuprizone Model of Multiple Sclerosis. PLoS ONE 10(6): e0129217. doi:10.1371/journal.pone.0129217

**Academic Editor:** Arun Rishi, Wayne State University, UNITED STATES

**Received:** February 24, 2015

**Accepted:** May 6, 2015

**Published:** June 8, 2015

**Copyright:** © 2015 Solti et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the paper.

**Funding:** This work was supported by Hungarian grants OTKA NN109841 (FG) and PTE AOK KA 2013/4 (ZB). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

## Abstract

Previous studies on the degenerative animal model of multiple sclerosis suggested that the copper-chelator cuprizone might directly suppress T-cell functions. Peripheral T-cell function in the cuprizone model has already been explored; therefore, in the present study, we investigated, for the first time, how cuprizone feeding affects the thymus, the organ of T-cell maturation and selection. We found that even one week of cuprizone treatment induced significant thymic atrophy, affecting the cortex over the medulla. Fluorescent microscopy and flow-cytometric analyses of thymi from cuprizone- and vehicle-treated mice indicated that eradication of the cluster of the differentiation-4 (CD4)-CD8 double-positive T-cell subset was behind the substantial cell loss. This result was confirmed with CD3-CD4-CD8 triple-staining experiments. Ultrastructurally, we observed degraded as well as enlarged mitochondria, myelin-bodies, large lipid droplets, and large lysosomes in the thymi of cuprizone-treated mice. Some of these features were similar to those in physiological and steroid-induced accelerated aging. According to our results, apoptosis was mainly of mitochondrial origin mediated by both caspase-3- and apoptosis inducing factor-mediated mechanisms. Additionally, mitogen activated protein kinase activation and increased pro-apoptotic B cell lymphoma-2 family protein expression were the major underlying processes. Our results do not indicate a functional relationship between cuprizone-induced thymus involution and the absence of inflammatory responses or the selective demyelination observed in the cuprizone model. On the other hand, due to the reversible nature of cuprizone's deleterious effects, the cuprizone model could be valuable in studying thymus regeneration as well as remyelination processes.

kvell.krisztian\_95\_23



# Alteration in the Wnt microenvironment directly regulates molecular events leading to pulmonary senescence

Tamas Kovacs,<sup>1,2</sup> Veronika Csongei,<sup>1,2</sup> Diana Feller,<sup>1,2</sup> David Ernszt,<sup>1,2</sup> Gabor Smuk,<sup>3</sup> Veronika Sarosi,<sup>4</sup> Laszlo Jakab,<sup>5</sup> Krisztian Kvell,<sup>1,2</sup> Domokos Bartis<sup>6</sup> and Judit E. Pongracz<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Medical School, Department of Pharmaceutical Biotechnology, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>2</sup>János Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>3</sup>Medical School, Department of Pathology, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>4</sup>Medical School, Department of Pulmonology, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>5</sup>Medical School, Department of Surgery, University of Pécs, Pécs, Hungary

<sup>6</sup>Department of Clinical Respiratory Sciences, Centre for Translational Inflammation Research, University of Birmingham Research Laboratories, Queen Elizabeth Hospital, Birmingham, UK

## Summary

**In the aging lung, the lung capacity decreases even in the absence of diseases. The progenitor cells of the distal lung, the alveolar type II cells (ATII), are essential for the repair of the gas-exchange surface. Surfactant protein production and survival of ATII cells are supported by lipofibroblasts that are peroxisome proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ )-dependent special cell type of the pulmonary tissue. PPAR $\gamma$  levels are directly regulated by Wnt molecules; therefore, changes in the Wnt microenvironment have close control over maintenance of the distal lung. The pulmonary aging process is associated with airspace enlargement, decrease in the distal epithelial cell compartment and infiltration of inflammatory cells. qRT-PCR analysis of purified epithelial and nonepithelial cells revealed that lipofibroblast differentiation marker parathyroid hormone-related protein receptor (PTHrP) and PPAR $\gamma$  are reduced and that PPAR $\gamma$  reduction is regulated by Wnt4 via a  $\beta$ -catenin-dependent mechanism. Using a human *in vitro* 3D lung tissue model, a link was established between increased PPAR $\gamma$  and pro-surfactant protein C (pro-SPC) expression in pulmonary epithelial cells. In the senile lung, both Wnt4 and Wnt5a levels increase and both Wnt-s increase myofibroblast-like differentiation. Alteration of the Wnt microenvironment plays a significant role in pulmonary aging. Diminished lipo- and increased myofibroblast-like differentiation are directly regulated by specific Wnt-s, which process also controls surfactant production and pulmonary repair mechanisms.**

**Key words:** molecular biology of aging; pulmonary senescence; Wnt microenvironment.

## Introduction

In the aging lung, the total tissue mass decreases along with the number of capillaries. Formation of new alveoli is also limited. Due to decrease in tissue mass as well as muscle weakness, lung capacity declines with age even in healthy individuals (Tolep *et al.*, 1995; Polkey *et al.*, 1997). As senescence progresses, lung tissue becomes prone to inflammation, fibrosis and tumors demolishing lung capacity. Infections are frequent in the pulmonary tract of the elderly, leading to a chronic cycle of injury and repair that causes significant changes in the structure, function and gene expression of alveolar epithelial cells contributing to the development of chronic pulmonary diseases (Baarsma *et al.*, 2011; Chilosi *et al.*, 2012). Studies suggest that the senile lung is characterized by airspace enlargement similar to acquired emphysema (Verbeken *et al.*, 1992) even detected in nonsmokers above 50 years of age (Sharma & Goodwin, 2006; Calvi *et al.*, 2011). Similarly to humans, aging of the mouse lung is associated with homogeneous airspace enlargement.

The aging process of the lung is complex both in test animals and humans. Apart from decreased ability to withstand infections, low level chronic inflammatory processes are frequently detected (Meyer *et al.*, 1996). The low level chronic inflammation is associated with tissue destruction requiring effective tissue regeneration (Crosby & Waters, 2010) coordinated by epithelial progenitor cells. The progenitor cells originate from the five putative stem cell niches primarily identified in the lungs of mice (Engelhardt, 2001). The cells responsible for cellular regeneration in the bronchiolar region are the nonciliated epithelial cuboid Clara cells (Park *et al.*, 2006) while in the gas-exchange region of the alveoli, ATII cells drive the regenerative process. ATII cells are capable of transdifferentiation into ATI cells (Crosby & Waters, 2010; Rock *et al.*, 2011; Barkauskas *et al.*, 2013) providing the gas exchange surface of alveoli. ATII cells are also important in producing surfactant proteins responsible for lowering surface tension in the alveoli aiding gas exchange and stabilizing alveolar structure (Rooney *et al.*, 1994). Surfactants also have immune-modulatory activity in the host defense system (Veldhuizen & Possmayer, 2004; Maina *et al.*, 2010) making the presence of a well-maintained ATII cell population essential.

Although ATII cells are vitally important, ATII-s are unable to take up triglycerides directly from the blood and need the help of lipofibroblasts (Torday *et al.*, 1995; Rehan & Torday, 2012). Lipofibroblasts can take up triglycerides and accumulate lipid droplets generated by a proliferator-activated receptor gamma (PPAR $\gamma$ ) (Ferguson *et al.*, 2009) and adipose differentiation-related protein (ADRP) (Gao & Serrero, 1999; Schultz *et al.*, 2002)-dependent mechanism.

In recent studies, the secreted Wnt glycolipoprotein ligand family (Pongracz & Stockley, 2006) have been reported to regulate both aging (Brack *et al.*, 2007) and PPAR $\gamma$  activity (Takada *et al.*, 2009; Talaber *et al.*, 2011). The two main and best characterized Wnt pathways are the  $\beta$ -catenin-dependent or canonical and the  $\beta$ -catenin-independent or noncanonical pathways (Pongracz & Stockley, 2006). While the canonical Wnts antagonize the PPAR $\gamma$  function (Takada *et al.*, 2009), noncanonical Wnts have not been reported to affect PPAR $\gamma$  transcription or activity. Recent studies conducted in aging mice have connected PPAR $\gamma$  to lipofibroblast differentiation (Willis & Borok, 2007; Paxson

## Correspondence

Dr. Judit E. Pongracz, Medical School, Department of Pharmaceutical Biotechnology, Szentágotthai Research Centre, University of Pécs, 12 Szigeti Str, Pécs 7624, Hungary. Tel.: +36 30 435 7944; fax: +36 72 501 654; e-mail: pongracz.e.judit@pte.hu

Accepted for publication 22 May 2014

kvell.krisztian\_95\_23





Contents lists available at ScienceDirect

Immunobiology

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/imbio](http://www.elsevier.com/locate/imbio)

## Active Wnt/beta-catenin signaling is required for embryonic thymic epithelial development and functionality *ex vivo*



Krisztian Kvell<sup>a,\*</sup>, Aniko V. Fejes<sup>a</sup>, Sonia M. Parnell<sup>b</sup>, Judit E. Pongracz<sup>a,b</sup>

<sup>a</sup> Department of Pharmacological Biotechnology, University of Pecs, Hungary

<sup>b</sup> Department of Anatomy, Division of Immunity and Infection, Institute for Biomedical Research, University of Birmingham, UK

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 13 July 2013

Accepted 25 March 2014

Available online 2 April 2014

#### Keywords:

Embryonic development

FoxN1

ICAT

Thymic epithelium

Wnt

### ABSTRACT

The Wnt/beta-catenin signaling pathway plays an important role in the commitment and development of thymic epithelial precursors. Here we document similarities of thymic epithelial development during embryogenesis in human and mouse. We stained for thymic epithelial surface markers (EpCAM1, Ly51, K8) and ligand/receptor pair (Wnt4, Fz4). Our results confirm the relevance of using murine test systems to model human embryonic thymic epithelial cell development.

We have efficiently transduced murine embryonic epithelial cells using mock (GFP) and Wnt/beta-catenin-inhibiting (ICAT-encoding) recombinant adenoviral vectors. The effect of Wnt4 was assayed in the form of Wnt4-containing supernatant. Gene expression changes were assessed by Q-PCR and also morphology using conventional and confocal fluorescent microscopy. Functional aberration caused by ICAT was assessed through evaluation of thymocyte maturation.

Our results demonstrate that ICAT and Wnt4 have reciprocal effects during embryonic thymic epithelial cell development. While Wnt4 is capable of increasing the expression level of characteristic intracellular (FoxN1), surface (MHCII) and secreted (IL7) molecules, Wnt/beta-catenin inhibition through ICAT can moderately decrease their expression. Morphological changes induced by ICAT resulted in the development of hollow, inflated thymic lobes with reduced epithelial cell numbers. The ICAT-treated thymic lobes also showed significant impairment in supporting thymocyte development and maturation.

© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

### Introduction

Along with Notch and BMP, the abundantly secreted Wnt (wingless-related MMTV integration site) glycoproteins have been proposed to play an elementary role in the development, maintenance and functional integrity of the thymic stroma (Bleul and Boehm 2005; Pongracz et al. 2003; Osada et al. 2006; Anderson et al. 2001). The current article focuses on the evolutionarily conserved molecular family of secreted Wnt glycoproteins. The nineteen known Wnt glycoproteins signal through ten G-protein dependent receptors, called Frizzled receptors. For active signal transduction,

**Abbreviations:** BMP, bone morphogenic protein; EpCAM, epithelial cell adhesion molecule; FoxN1, forkhead box N1; Fz, frizzled; GFP, green fluorescent protein; ICAT, inhibitor of beta-catenin; IL7, interleukin 7; K, keratin; LRP, low density lipoprotein receptor-related proteins; MHCII, major histocompatibility complex II; TCF, T-cell factor; rAd, recombinant adeno-viruses; Wnt, wingless-related MMTV integration site.

\* Corresponding author at: Department of Pharmacological Biotechnology, University of Pecs, 20 Ifjusag Street, H-7624 Pecs, Hungary. Tel.: +36 72 536 000/29250. E-mail address: [kvell.krisztian@pte.hu](mailto:kvell.krisztian@pte.hu) (K. Kvell).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.03.017>

0171-2985/© 2014 Elsevier GmbH. All rights reserved.

Frizzled receptors need to form a complex with low density lipoprotein receptor-related proteins (LRP), as co-receptors. The actual constellation of the ligand, receptor and co-receptor defines Wnt-mediated effects in a context-dependent manner (Mikels and Nusse 2006; Gordon and Nusse 2006; Schweizer and Varmus 2003). Wnt4 is in spotlight of the current work being one of the most abundantly expressed non-canonical Wnt molecule secreted by the thymic epithelium during embryonic development, with expression levels progressively decreasing during postnatal development and aging (Kvell et al. 2010; Kvell and Pongracz 2011; Varecza et al. 2011). It is of note that FoxN1 (a key transcription factor that defines thymic epithelial identity) is an acknowledged target gene of Wnt4 in the thymic epithelial context (Balciunaite et al. 2002). ICAT (inhibitor of beta-catenin and TCF-4) is a polypeptide that inhibits Wnt/beta-catenin nuclear signaling by binding and competing its interaction with the transcription factor TCF (T cell factor) in the nucleus. Therefore ICAT is an intracellular negative regulator of the Wnt/beta-catenin pathway (Pongracz et al. 2006). Since the Wnt glycoproteins and Wnt4 in particular are key players of embryonic thymic epithelial development we examined the effect of both increased Wnt-effect (additional Wnt4 in the form of supernatant)

kvell.krisztian\_95\_23

# Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma

Domokos Bartis<sup>1,2,3</sup>, Veronika Csongei<sup>1,6,9</sup>, Alexander Weich<sup>1</sup>, Edit Kiss<sup>1,6</sup>, Szilvia Barko<sup>3</sup>, Tamas Kovacs<sup>1,6</sup>, Monika Avdicevic<sup>1</sup>, Vijay K. D'Souza<sup>2</sup>, Judit Rapp<sup>1,6</sup>, Krisztian Kvell<sup>1,6</sup>, Laszlo Jakab<sup>4</sup>, Miklos Nyitrai<sup>2,6</sup>, Tamas F. Molnar<sup>4</sup>, David R. Thickett<sup>2</sup>, Terezia Laszlo<sup>5</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,6\*</sup>

**1** Department of Medical Biotechnology, Institute of Immunology and Biotechnology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **2** Department of Medicine, Medical School, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom, **3** Department of Biophysics, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **4** Department of Surgery, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **5** Department of Pathology, Medical School, University of Pecs, Pecs, Hungary, **6** Szentagotai Research Center, University of Pecs, Pecs, Hungary

## Abstract

The majority of lung cancers (LC) belong to the non-small cell lung carcinoma (NSCLC) type. The two main NSCLC sub-types, namely adenocarcinoma (AC) and squamous cell carcinoma (SCC), respond differently to therapy. Whereas the link between cigarette smoke and lung cancer risk is well established, the relevance of non-canonical Wnt pathway up-regulation detected in SCC remains poorly understood. The present study was undertaken to investigate further the molecular events in canonical and non-canonical Wnt signalling during SCC development. A total of 20 SCC and AC samples with matched non-cancerous controls were obtained after surgery. TaqMan array analysis confirmed up-regulation of non-canonical Wnt5a and Wnt11 and identified down-regulation of canonical Wnt signalling in SCC samples. The molecular changes were tested in primary small airway epithelial cells (SAEC) and various lung cancer cell lines (e.g. A549, H157, etc). Our studies identified Wnt11 and Wnt5a as regulators of cadherin expression and potentiated relocation of  $\beta$ -catenin to the nucleus as an important step in decreased cellular adhesion. The presented data identifies additional details in the regulation of SCC that can aid identification of therapeutic drug targets in the future.

**Citation:** Bartis D, Csongei V, Weich A, Kiss E, Barko S, et al. (2013) Down-Regulation of Canonical and Up-Regulation of Non-Canonical Wnt Signalling in the Carcinogenic Process of Squamous Cell Lung Carcinoma. PLoS ONE 8(3): e57393. doi:10.1371/journal.pone.0057393

**Editor:** Srikumar P. Chellappan, H. Lee Moffitt Cancer Center & Research Institute, United States of America

**Received:** August 8, 2012; **Accepted:** January 23, 2013; **Published:** March 7, 2013

**Copyright:** © 2013 Bartis et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** This work was supported by the TAMOP-4.2.1.B-10/2/KONV-2010-0002; (Társadalmi Megújulás Operatív Program); TIOP 1.3.1-07/1-2F-2008-0002 (Társadalmi Infrastruktúra Operatív Program); K-OTKA\_67807\_A\_07 -2-2012-0093328 (MAG Zrt-NKTH(NFU)-OTKA(Magyar Gazdaságfejlesztési Központ Zrt-Nemzeti Kutatástámogatási Hivatal (Nemzeti Fejlesztési Ügynökség)-Országos Tudományos Kutatási Alapprogramok Iroda or Hungarian Scientific Research Fund) all to JEP and by the K-OTKA grant 34039/KA-OTKA/11-02 to DB. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: judit.e.pongracz@aok.pte.hu

These authors contributed equally to this work.

## Introduction

Lung cancer (LC) is the leading cause of cancer death worldwide [1]. About 80% of LCs belongs to the NSCLC type which is erroneously considered as a single entity. The two main NSCLC sub-types, namely AC that arises mostly in the peripheral airways or the bronchio-alveolar region of the parenchyma, and SCC that develops mainly in the proximal airways and affects mostly cigarette smokers, differs not only in aggressiveness but responsiveness to chemotherapy, also. To make the overall picture more complicated, there are an emerging number of combined NSCLCs where malignant tumours are representing themselves as adeno-squamous or mixed type LC. Not surprisingly, the molecular background of AC and SCC development has been a focus of intense investigation. In various studies Wnt signalling has emerged as one of the potential regulators of the carcinogenic process.

## Wnt Signalling

Wnt signalling regulates a variety of developmental processes including cell fate specification, proliferation, polarity and migration (reviewed in [2]). Wnt molecules trigger gene transcription via at least three signalling pathways: the canonical or  $\beta$ -catenin dependent, and two non-canonical pathways. When Wnts bind to their trans-membrane receptors, Frizzleds (Fzd) and co-receptors, LRP5/6, signal transduction begins on the canonical pathway. Once stabilized, non-degraded  $\beta$ -catenin molecules move to the nucleus where they activate TCF-LEF-dependent gene transcription. In the absence of Wnt signals, the cytoplasmic  $\beta$ -catenin is subjected to phosphorylation in the APC-Axin-GSK3 $\beta$ -complex [2] then to subsequent proteasomal degradation. Upon non-canonical Wnt signals, the JNK/API dependent, planar cell polarity (PCP) and the PKC/CAMKII/NFAT dependent Ca<sup>2+</sup> pathways are activated.

kvell.krisztian\_95\_23

# Fine-tuning of proximal TCR signaling by ZAP-70 tyrosine residues in Jurkat cells

M. Szabo, T. Czompoly, K. Kvell, G. Talaber, D. Bartis, P. Nemeth, T. Berki and F. Boldizsar

Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, H-7643 Pecs, Hungary

Correspondence to: F. Boldizsar, Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, H-7643 Pecs, Szigeti ut 12, Hungary;  
E-mail: ferenc.boldizsar@aok.pte.hu

Received 28 September 2011, accepted 10 November 2011

## Abstract

Zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa (ZAP-70) kinase is a key regulator in the early steps of TCR signaling but some aspects of its fine regulation are still unclear. From its 31 tyrosine (Y) residues, 11 phosphorylation sites have been identified, some with activator (Y315 and Y493) or inhibitory (Y292 and Y492) and others with unknown function (Y069, Y126 and Y178). In our present work, we aimed to elucidate the role of different Y residues of ZAP-70, especially those with unknown function, in calcium signaling and the autoregulation of the kinase. ZAP-70-deficient Jurkat cells (P116) were stably reconstituted with point-mutated ZAP-70 constructs where tyrosine residues 069, 126, 178, 238, 292, 315, 492 or 493 were replaced with phenylalanine (F). The anti-CD3-elicited calcium signal increased in F069-, F292- and F492-ZAP-70-expressing cell lines but decreased in the F126-, F315- and F493-ZAP-70-expressing cell lines. ZAP-70 point mutations led to phosphorylation changes predominantly in SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa (SLP-76) but not linker of activated T cells (LAT) during CD3-activation; moreover, we detected basal hyperphosphorylation of SLP-76 Y128 in the F126-, F178- and F492-ZAP-70-expressing cell lines. In summary, Y069, Y178, Y292 and Y492 have inhibitory, while Y126, Y315 and Y493 activator role in anti-CD3-induced T-cell activation. Phosphorylation changes in LAT and SLP-76 suggest that fine regulation of ZAP-70 on calcium signaling is rather transmitted through SLP-76 not LAT. Additionally, negative or positive autoregulatory function of Y292 and Y493 or Y315, respectively, was revealed in ZAP-70. These data indicate that previously not characterized Y069, Y126 and Y178 in ZAP-70 participate in the fine regulation of TCR signaling.

**Keywords:** lentiviral transfection, site-directed mutagenesis, TCR signaling, ZAP-70

## Introduction

T cells are key players of adaptive immunity: they recognize peptide antigens with their TCR in an MHC-restricted manner (1, 2), which leads to their activation/differentiation and the engagement of effector mechanisms. Co-receptors, like CD4 or CD8, CD28 and the protein tyrosine phosphatase CD45 are also involved in TCR mediated signaling (3–5). A complex network of signaling events is prerequisite for T-cell activation. Upon close TCR–peptide–MHC binding, early phosphorylation steps are initiated. First, the sarcoma (Src) non-receptor tyrosine kinase family member, lymphocyte-specific protein tyrosine kinase (Lck) (CD4/8 associated) is primed by the phosphatase CD45 through the removal of an inhibitory phosphate group from tyrosine (Y)505 (6). Next, Lck is activated by the phosphorylation of Y394 by the activated TCR complex (6). The activated Lck, in turn, phosphorylates immunoreceptor tyrosine-based activation motifs found in the TCR-associated CD3 complex (7). The phosphorylated CD3

ζ chain provides a docking site for the spleen tyrosine kinase (Syk) family member zeta-chain-associated protein kinase of 70kDa (ZAP-70) kinase (8).

ZAP-70 is phosphorylated by Lck and activated to become a key organizer of downstream TCR signaling steps. Two important target molecules of the ZAP-70 are the adapter proteins linker of activated T cells (LAT) and SH2 domain containing leukocyte protein of 76kDa (SLP-76) (9–11). Phosphorylation of these molecules leads to the formation of a multimolecular complex involving growth factor receptor-bound protein 2 (GRB2), IL2-inducible T-cell kinase, GRB2-related adaptor downstream of Src homology 2 domain containing transforming protein (Shc) and Vav that results in activation of phospholipase C-γ1 (PLCγ1) (12, 13). PLCγ1, in turn, cleaves phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate producing two second messengers: inositol 1,4,5-trisphosphate (IP<sub>3</sub>) and diacylglycerol (DAG) (14). DAG initiates two major pathways

kvell.krisztian\_95\_23

## Wnt-4 Protects Thymic Epithelial Cells against Dexamethasone-Induced Senescence

Gergely Talaber,<sup>1</sup> Krisztian Kvell,<sup>1</sup> Zoltan Varecza,<sup>1</sup> Ferenc Boldizsar,<sup>1</sup> Sonia M. Parnell,<sup>2</sup>  
Eric J. Jenkinson,<sup>2</sup> Graham Anderson,<sup>2</sup> Timea Berki,<sup>1</sup> and Judit E. Pongracz<sup>1</sup>

### Abstract

Glucocorticoids are widely used immunosuppressive drugs in treatment of autoimmune diseases and hematological malignancies. Glucocorticoids are particularly effective immune suppressants, because they induce rapid peripheral T cell and thymocyte apoptosis resulting in impaired T cell-dependent immune responses. Although glucocorticoids can induce apoptotic cell death directly in developing thymocytes, how exogenous glucocorticoids affect the thymic epithelial network that provides the microenvironment for T cell development is still largely unknown. In the present work, we show that primary thymic epithelial cells (TECs) express glucocorticoid receptors and that high-dosage dexamethasone induces degeneration of the thymic epithelium within 24 h of treatment. Changes in organ morphology are accompanied by a decrease in the TEC transcription factor FoxN1 and its regulator Wnt-4 parallel with upregulation of lamina-associated polypeptide 2 $\alpha$  and peroxisome proliferator activator receptor  $\gamma$ , two characteristic molecular markers for adipose thymic involution. Overexpression of Wnt-4, however, can prevent upregulation of adipose differentiation-related aging markers, suggesting an important role of Wnt-4 in thymic senescence.

### Introduction

**A**UTOIMMUNE DISEASES AND HEMATOLOGICAL malignancies are significant causes of morbidity and mortality world wide.<sup>1,2</sup> Although research is ongoing, treatment options are still often limited to high-dosage synthetic glucocorticoid (GC) analogs despite their nonspecificity and multiple side effects. Indeed, GCs are still applied in therapy for acute and chronic autoimmune diseases and hematological malignancies,<sup>3,4</sup> because they effectively promote apoptosis of leukemia cells<sup>5</sup> and trigger complex anti-inflammatory actions by influencing both molecular and cellular components of the immune system.<sup>6</sup> Apart from triggering decreased expression of cytokines and major histocompatibility complex class II (MHC II), GCs also induce apoptotic death of peripheral<sup>7</sup> and developing T cells. In mouse models, GCs cause massive thymocyte depletion, especially in the CD4<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup> (double positive [DP]) thymocyte population,<sup>8–12</sup> blocking *de novo* T cell production.

Prior experiments have also demonstrated that high-dose GCs induce a dramatic<sup>13</sup> and apoptosis-associated<sup>14</sup> involution of the thymus, and not only thymocytes but also thymic epithelial cells (TECs) are seriously affected.<sup>15</sup> Additionally, a recent report by Fletcher et al.<sup>16</sup> has highlighted that TEC

depletion appears reversible, and thymic epithelial stem cells play an important role in this process.

Because physiological steroids are implicated in the regulation of aging,<sup>17,18</sup> we theorized that GC treatment might affect thymic epithelial senescence. Although morphological similarities between physiological and induced thymic involution are striking, to date the process has not been studied in detail at the molecular level. One possible mechanism is that during physiological aging TECs undergo epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and then preadipose differentiation.<sup>19,20</sup> Our studies have recently provided evidence that this process is regulated by Wnt-4 and FoxN1 decline, leading to drastic reduction in TEC identity<sup>21,22</sup> and simultaneous upregulation of lamina-associated polypeptide (LAP) 2 $\alpha$  as well as preadipocyte-related markers peroxisome proliferator activator receptor (PPAR)  $\gamma$  and adipose differentiation-related protein (ADRP).<sup>20</sup>

On the basis of the above studies, we theorized that GCs do not simply deplete thymocytes and the majority of TECs, but they also inhibit the function of the remaining epithelium via downregulation of characteristic TEC markers, leading to preadipocyte differentiation. In the present study, we provide evidence that both primary TECs and the primary TEC-derived TEP1 cell line express glucocorticoid receptors (GRs)

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Faculty of Medicine, Pecs, Hungary.

<sup>2</sup>Department of Anatomy, Institute for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Birmingham, United Kingdom.

kvell.krisztian\_95\_23





Contents lists available at ScienceDirect

## Mechanisms of Ageing and Development

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/mechagedev](http://www.elsevier.com/locate/mechagedev)

## Multiple suppression pathways of canonical Wnt signalling control thymic epithelial senescence

Zoltan Varecza<sup>a</sup>, Krisztian Kvell<sup>a</sup>, Gergely Talabér<sup>a</sup>, Gyorgy Miskei<sup>a</sup>, Veronika Csongei<sup>a</sup>, Domokos Bartis<sup>a</sup>, Graham Anderson<sup>b</sup>, Eric J. Jenkinson<sup>b</sup>, Judit E. Pongracz<sup>a,\*</sup><sup>a</sup> Department of Medical Biotechnology, Institute for Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Pécs, Hungary<sup>b</sup> Institute for Biomedical Research, Faculty of Medicine, University of Birmingham, Birmingham, UK

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 22 October 2010

Received in revised form 25 March 2011

Accepted 14 April 2011

Available online 27 April 2011

## Keywords:

Wnt signalling

PKC $\delta$ 

Thymic epithelium

Thymic atrophy

## ABSTRACT

Members of the Wnt family of secreted glyco-lipo-proteins affect intrathymic T-cell development and are abundantly secreted by thymic epithelial cells (TECs) that create the specific microenvironment for thymocytes to develop into mature T-cells. During ageing, Wnt expression declines allowing adipoid involution of the thymic epithelium leading to reduced naïve T-cell output. The protein kinase C (PKC) family of serine-threonine kinases is involved in numerous intracellular biochemical processes, including Wnt signal transduction. In the present study, PKC $\delta$  expression is shown to increase with age and to co-localise with Wnt receptors Frizzled (Fz)-4 and -6. It is also demonstrated that connective tissue growth factor (CTGF) is a Wnt-4 target gene and is potentially involved in a negative feed-back loop of Wnt signal regulation. Down-regulation of Wnt-4 expression and activation of multiple repressor pathways suppressing  $\beta$ -catenin dependent signalling in TECs contribute to the initiation of thymic senescence.

© 2011 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

## 1. Introduction

During ageing of the immune system the gradual loss of naïve T-cells is associated with the rate of thymic adipose involution that correlates with significant destruction of the epithelial network. As impaired T-cell production leads to weakened immune responses, understanding the mechanism of thymic involution has high physiological and medical importance.

In our recent studies of thymic involution Wnt-4 secretion was significantly reduced in TECs while LAP2 $\alpha$  expression concomitantly increased triggering epithelial-mesenchymal transition (EMT) and then pre-adipocyte-differentiation (Kvell et al., 2010).

As Wnt-4 is the primary regulator of FoxN1 expression and consequently TEC identity, understanding Wnt-4 signalling carries particularly high importance (Balciunaite et al., 2002). The difficulty of signalling studies, however, stems from the general complexity of Wnt pathways (Kuhl and Pandur, 2009). Wnt-4, for example, has been described as activator of both  $\beta$ -catenin dependent canonical (Lyons et al., 2004) and JNK/PKC dependent non-canonical (Cai et al., 2002; Du et al., 1995)

signalling pathways that interact at multiple levels. Apart from specific, there are also shared signalling elements in Wnt pathways including the main cell surface receptors Frizzleds (Fz) (Schulte and Bryja, 2007) as well as intracellular signalling molecules including G proteins (Malbon et al., 2001), Dishevelleds (Dvl) (Kuhl et al., 2001; Schulte and Bryja, 2007) and PKCs  $\alpha$  (Kuhl et al., 2001),  $\zeta$  (Ossipova et al., 2003), and  $\delta$  (Kinoshita et al., 2003). PKC $\delta$  appears particularly important as this serine-threonine kinase can phosphorylate and therefore activate Dvls (Kinoshita et al., 2003) to relay ligand induced signals towards down-stream elements of Wnt cascades.

From the ten known mammalian Fz receptors, Fz-4 (Lyons et al., 2004) and Fz-6 (Lyons et al., 2004) have been confirmed to bind Wnt-4. Interestingly, while Fz-4 is an activator of the  $\beta$ -catenin dependent canonical pathway, signals from Fz-6 inhibit  $\beta$ -catenin dependent target gene transcription (Golan et al., 2004) indicating that regulation of Wnt-4 signalling might also begin at receptor level in the thymus.

As thymic involution is a complex physiological process and appears to be initiated by suppression of Wnt signals, understanding of receptor associated regulatory mechanisms can lead to target molecule recognition in the quest for re-juvenate the ageing thymus. To investigate the hypothesis, TECs of young and ageing adult Balb/c mice as well as a thymic epithelial cell line, TEP1 were used in the studies. Our experiments demonstrate that expression of Wnt receptors increase with age and that Frizzleds co-localize

\* Corresponding author at: Department of Medical Biotechnology, Institute for Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 12 Szegeti, Pécs H-7624, Hungary. Tel.: +36 72 536 288; fax: +36 72 536 289.

E-mail address: [judit.e.pongracz@aok.pte.hu](mailto:judit.e.pongracz@aok.pte.hu) (J.E. Pongracz).

kvell.krisztian\_95\_23

## Increased Chondrocyte Death after Steroid and Local Anesthetic Combination

Boglárka Farkas MD, Krisztián Kvell MD, PhD,  
Tamás Czömpöly MD, PhD, Tamás Illés MD, PhD,  
Tamás Bárdos MD, PhD

Received: 17 August 2009 / Accepted: 8 June 2010 / Published online: 11 August 2010  
© The Association of Bone and Joint Surgeons® 2010

### Abstract

**Background** Hyaline articular cartilage has limited repair and regeneration capacity. Intraarticular administration of glucocorticoid and local anesthetic injections play an important role in the therapy of osteoarthritis. Glucocorticoids and anesthetics reportedly enhance apoptosis in chondrocytes, but effects of the combined use of glucocorticoids and local anesthetics are unknown.

**Questions/purposes** We asked whether glucocorticoid and local anesthetic agents combined had any synergistic effects on chondrocyte apoptosis.

**Methods** Cell viability and apoptosis/necrosis assessment of human articular chondrocytes were performed in vitro (chondrocyte cell cultures) and ex vivo (osteochondral specimens) using flow cytometry and TUNEL analysis, respectively.

**Results** Glucocorticoids and local anesthetics induce apoptosis in chondrocytes at various rates. When used in combination, the percentage of dead chondrocytes was increased in in vitro chondrocyte cell cultures and osteochondral ex vivo specimens.

**Conclusions** We observed a time-dependent decrease in chondrocyte viability after concurrent steroid and local anesthetic exposure.

**Clinical Relevance** The combination of glucocorticoids and local anesthetics has an adverse effect on articular chondrocytes, and it raises a question regarding whether concomitant administration should be used in treating osteoarthritis.

### Introduction

Osteoarthritis is the most common form of joint disease and represents the most notable basis of disability afflicting greater than 5% of the world's population [11, 29]. Osteoarthritis is characterized by progressive erosion, degradation, and degeneration of the articular cartilage, osteophyte formation, and subchondral changes. If articular cartilage damage is not extensive, nonoperative treatment is preferable.

According to the European League Against Rheumatism (EULAR) recommendation, the optimal treatment of osteoarthritis constitutes a combination of nonpharmacologic and pharmacologic therapeutic modalities [1, 19, 22]. The nonoperative pharmacologic treatments include putative oral chondroprotective drugs (dietary supplements), oral or topical nonsteroidal antiinflammatory drugs, and intraarticular injections such as corticosteroids, local anesthetics, or viscosupplementing agents.

One or more of the authors (TB) have received funding from the Mutual Foundation of the Ministry of Economy and European Union (GVOP Project 3.1.1-2004-05-0219/3.0), ETT National Scientific Committee for Health-related Researches, and the János Bolyai Research Fellowship and Research Foundation (OTKA 53065). Each author certifies that his or her institution has approved the human protocol for this investigation, that all investigations were conducted in conformity with ethical principles of research, and informed consent for participation in the study was obtained.

B. Farkas, T. Illés, T. Bárdos (✉)  
Department of Orthopaedics, University of Pécs, Ifjúság u. 13,  
7624 Pécs, Hungary  
e-mail: tbardos@hotmail.com

B. Farkas  
Department of Anatomy, University of Pécs, Pécs, Hungary  
e-mail: boglarka\_farkas@hotmail.com

K. Kvell, T. Czömpöly  
Department of Immunology and Biotechnology, University  
of Pécs, Pécs, Hungary

kvell.krisztian\_95\_23

# Wnt4 and LAP2alpha as Pacemakers of Thymic Epithelial Senescence

Krisztian Kvell<sup>1</sup>, Zoltan Varecza<sup>1</sup>, Domokos Bartis<sup>1</sup>, Sebastian Hesse<sup>1</sup>, Sonia Parnell<sup>2</sup>, Graham Anderson<sup>2</sup>, Eric J. Jenkinson<sup>2</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2\*</sup>

<sup>1</sup> Department of Medical Biotechnology, Institute for Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Pecs, Hungary, <sup>2</sup> Division of Immunity and Infection, Department of Anatomy, Institute for Biomedical Research, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

## Abstract

Age-associated thymic involution has considerable physiological impact by inhibiting *de novo* T-cell selection. This impaired T-cell production leads to weakened immune responses. Yet the molecular mechanisms of thymic stromal adipose involution are not clear. Age-related alterations also occur in the murine thymus providing an excellent model system. In the present work structural and molecular changes of the murine thymic stroma were investigated during aging. We show that thymic epithelial senescence correlates with significant destruction of epithelial network followed by adipose involution. We also show in purified thymic epithelial cells the age-related down-regulation of Wnt4 (and subsequently FoxN1), and the prominent increase in LAP2 $\alpha$  expression. These senescence-related changes of gene expression are strikingly similar to those observed during mesenchymal to pre-adipocyte differentiation of fibroblast cells suggesting similar molecular background in epithelial cells. For molecular level proof-of-principle stable LAP2 $\alpha$  and Wnt4-over-expressing thymic epithelial cell lines were established. LAP2 $\alpha$  over-expression provoked a surge of PPAR $\gamma$  expression, a transcription factor expressed in pre-adipocytes. In contrast, additional Wnt4 decreased the mRNA level of ADRP, a target gene of PPAR $\gamma$ . Murine embryonic thymic lobes have also been transfected with LAP2 $\alpha$ - or Wnt4-encoding lentiviral vectors. As expected LAP2 $\alpha$  over-expression increased, while additional Wnt4 secretion suppressed PPAR $\gamma$  expression. Based on these pioneer experiments we propose that decreased Wnt activity and increased LAP2 $\alpha$  expression provide the molecular basis during thymic senescence. We suggest that these molecular changes trigger thymic epithelial senescence accompanied by adipose involution. This process may either occur directly where epithelium can trans-differentiate into pre-adipocytes; or indirectly where first epithelial to mesenchymal transition (EMT) occurs followed by subsequent pre-adipocyte differentiation. The latter version fits better with literature data and is supported by the observed histological and molecular level changes.

**Citation:** Kvell K, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, et al. (2010) Wnt4 and LAP2alpha as Pacemakers of Thymic Epithelial Senescence. PLoS ONE 5(5): e10701. doi:10.1371/journal.pone.0010701

**Editor:** Immo A. Hansen, New Mexico State University, United States of America

**Received:** February 4, 2010; **Accepted:** April 27, 2010; **Published:** May 18, 2010

**Copyright:** © 2010 Kvell et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Research was supported by the following grants: The Wellcome Trust grant No.: 079415 (grant-holders: J.E.P., G.A. and E.J.J.), 'Science Please' Research Team on Innovation grant No.: SROP-4.2.2/08/1/2008-0011 (grant holder: J.E.P.) and OTKA (Hungarian Scientific Research Fund) type: PD (post-doctoral) grant No.: 78310 (grant-holder: K.K.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: judit.e.pongracz@aok.pte.hu

## Introduction

### Thymic senescence

Thymic senescence begins early, around late puberty. This process is called adipose involution, as the thymus is invaded by adipose tissue [1]. Due to decrease in thymic epithelial tissue mass, the thymus can no longer support the same output of T-cell production [2]. Therefore peripheral blood T lymphocyte composition exhibits the dominance of memory T lymphocytes resulting in impaired responses towards novel, particularly viral infections [3,4,5]. Since the thymic epithelium has a key role in deleting auto-reactive T-cell clones, functional impairment increases the chances of developing auto-immune disease [6]. If we were able to slow down or even stop the loss of thymic epithelium the elderly would have a better chance to address late-onset autoimmune diseases and viral infections. However, despite studies of thymic senescence, the molecular mechanism of thymic aging remains elusive.

### Signaling pathways of thymic epithelial cell development and maintenance

Understanding signaling mechanisms that regulate tissue development and maintenance of thymic epithelial cells might reveal the process of adipose involution. Certainly, maintenance and functional integrity of the thymic stroma requires stimuli through Notch, BMP, and Wnt signaling pathways [7,8,9,10,11]. Undoubtedly, the Wnt family of secreted glycoproteins is one of the best analyzed among the required ligands [12]. Most members of the nineteen known Wnt glycoproteins have been implicated in both the development of embryonic thymus and the maintenance of adult thymic epithelium [13]. In the thymus, Wnt ligands originate primarily from thymic epithelial cells and activate a highly complex signaling network via ten G-protein dependent receptors called Frizzleds (Fz), and their co-receptors of low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6 called LRP5/6 [14,15]. The actual constellation of ligands, receptors, co-receptors and further regulatory molecules define Wnt-mediated effects.

kvell.krisztian\_95\_23

## Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis

Krisztián Kvell · Tamás Czömpöly · László Hiripi · Péter Balogh · József Kóbor · Lilla Bodrogi · Judit E. Pongrácz · William A. Ritchie · Zsuzsanna Bősze

Received: 23 February 2009 / Accepted: 19 May 2009 / Published online: 31 May 2009  
© Springer Science+Business Media B.V. 2009

**Abstract** Lentiviral technology is a powerful tool for the creation of stable transgenic animals. However, uncertainties have remained whether constitutive promoters resist long-term silencing. We used concentrated HIV-1 based lentiviral vectors to create stable transgenic BALB/c mice by perivitelline injection. In our vectors eGFP expression was driven by the human EF1 $\alpha$  promoter. The established transgenic animals were analyzed for eGFP expression by in vivo fluorescence imaging, PCR, histology and flow-cytometry. eGFP expression showed even distribution without mosaicism; however, tissue-dependent differences of eGFP expression were observed. Up to the sixth generation only one newborn showed eGFP inactivation. eGFP + transgenic bone marrow cells efficiently provided

long-term haemopoietic repopulation in radiation chimeras, regenerating all bone marrow-derived lineages with eGFP + cells with distinct eGFP expression profiles. The established eGFP + BALB/c mouse strain is expected to be extremely useful in various immunological experiments.

**Keywords** Balb/c · eGFP · Lentiviral transgenesis · Bone-marrow chimeric mouse

### Introduction

Lentiviral transgenesis has become an important and efficient new tool for the establishment of transgenic animals. The transgenic sequence most often used for ‘proof-of-principle’-type experiments is eGFP (enhanced green fluorescent protein). Concentrated lentiviral vectors efficiently transfect zygotes following perivitelline injection. With this method the nucleus of the zygote is not affected directly, and higher volumes may be injected with less sophisticated machinery. With lentiviral vectors the efficiency of stable, active transgenesis is significantly higher than with standard pronuclear injection, reaching 8–50% (Park 2007).

In the field of immunology a massive body of experimental evidence is derived from studies performed in mice with BALB/c genetic background (Bleul et al. 2006; Ivanov et al. 2006; Odegaard et al.

---

K. Kvell · T. Czömpöly · P. Balogh · J. E. Pongrácz  
Department of Immunology and Biotechnology,  
University of Pecs, Pecs, Hungary

L. Hiripi · L. Bodrogi · Z. Bősze (✉)  
Genetic Modification Program Group, Agricultural  
Biotechnology Center, P. O. Box 411, 2100 Gödöllő,  
Hungary  
e-mail: bosze@abc.hu

J. Kóbor  
Department of Oncotherapy, University of Pecs, Pecs,  
Hungary

W. A. Ritchie  
Roslin Embryology Limited, Edinburgh, Scotland, UK

kvell.krisztian\_95\_23



## Review Article

# Blurring Borders: Innate Immunity with Adaptive Features

K. Kvell,<sup>1</sup> EL. Cooper,<sup>2</sup> P. Engelmann,<sup>1</sup> J. Bovari,<sup>1</sup> and P. Nemeth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

<sup>2</sup>Laboratory of Comparative Neuroimmunology, Department of Neurobiology, David Geffen School of Medicine at UCLA, University of California, Los Angeles, CA 90095-1763, USA

Correspondence should be addressed to P. Nemeth, peter.nemeth@aok.pte.hu

Received 26 June 2007; Accepted 5 November 2007

Recommended by Yasunobu Yoshikai

Adaptive immunity has often been considered the penultimate of immune capacities. That system is now being deconstructed to encompass less stringent rules that govern its initiation, actual effector activity, and ambivalent results. Expanding the repertoire of innate immunity found in all invertebrates has greatly facilitated the relaxation of convictions concerning what actually constitutes innate and adaptive immunity. Two animal models, incidentally not on the line of chordate evolution (*C. elegans* and *Drosophila*), have contributed enormously to defining homology. The characteristics of specificity and memory and whether the antigen is pathogenic or nonpathogenic reveal considerable information on homology, thus deconstructing the more fundamentalist view. Senescence, cancer, and immunosuppression often associated with mammals that possess both innate and adaptive immunity also exist in invertebrates that only possess innate immunity. Strict definitions become blurred casting skepticism on the utility of creating rigid definitions of what innate and adaptive immunity are without considering overlaps.

Copyright © 2007 K. Kvell et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. INTRODUCTION: WHERE INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY CONVERGE

All multicellular animals (invertebrates and vertebrates) manage to keep self-integrity. Any attempt to answer questions concerning immune recognition must consider the universality of receptor-mediated responses. These may designate two forms: (1) rearranging clonally distributed antigen-specific receptors that distinguish between self and nonself according to classical Burnet hypothesis; and/or (2) pattern recognition receptors introduced by Janeway [1, 2]. The ideal immune system provides rapid and efficient responses, diverse repertoire of recognition, and effector molecules as well as specific memory on an individual level. In the self and nonself discrimination theory, the recognition receptors are central to immunity. However, a recently advanced hypothesis emphasizes that alarm signals have priority and initiate immune responses. These alarm danger signals released from the body's own cells are explained by the danger model of immunity. According to this model, immune cells must "decide" what poses harm to the body among self and nonself structures [3, 4]. The

two branches of vertebrate immunity (innate and adaptive) are dependent on each other. The innate immune system, responsible for the first encounter with a pathogen, can trigger adaptive immunity in case the initial response is ineffective. Both arms interact with each other, via cell-cell interactions and soluble factors maintaining a physiological steady state [5].

With this in mind, we felt compelled to clarify and extend what seems to be the blurring or masking of certain immunological characteristics of invertebrates and vertebrates [6–8]. To do this, we first define the general features of innate and adaptive immunities. Innate immunity is considered to be natural, nonspecific, nonanticipatory, and nonclonal but germ-line encoded; whereas adaptive immunity is indeed specific, anticipatory, clonal, and somatic. Then, we discuss the blurring of vertebrate and invertebrate immunological characteristics in the following sections: (1) a preface to adaptive immunity; (2) senescence, cancer, and immunosuppressive viruses; (3) invertebrate immunological memory triggered by nonpathogenic stimuli; (4) the dawn of adaptive immunity; and (5) perspectives on innate and adaptive immunity.

kvell.krisztian\_95\_23



## Species-specific restriction of cell surface expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines <sup>☆</sup>

Krisztián Kvell <sup>a</sup>, Tamás Czömpöly <sup>a</sup>, Timo Pikkarainen <sup>b</sup>, Péter Balogh <sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, Szégeti út 12, H-7634 Pécs, Hungary

<sup>b</sup> Division of Matrix Biology, Department of Medical Biochemistry and Biophysics, Karolinska Institute, S-171 77 Stockholm, Sweden

Received 5 January 2006

Available online 30 January 2006

### Abstract

The MARCO (macrophage receptor with collagenous structure) glycoprotein belongs to the scavenger receptor type family of pattern-recognition molecules produced by a subset of marginal zone macrophages in the spleen. Stimulation with LPS leads to its appearance on macrophages located at other tissue compartments. In the present work, we report its *in vitro* expression by various cell lines using transient and stable (lentiviral) gene delivery aimed at investigating the signaling properties of this receptor and its analysis using a novel rat monoclonal antibody against the SRCR-domain of mouse MARCO. When trying to establish stable mouse MARCO-transfectants using lentiviral transduction and other methods, we consistently found that MARCO accumulated intracellularly in various murine host cells. In contrast, such a phenomenon was not observed in non-murine cell lines. Our observations indicate the presence of an unexpected limitation of the *in vitro* expression of mouse MARCO glycoprotein in murine cell lines. We believe that the failure to express MARCO on the cell surface of the many murine cell lines is likely due to the absence of endoplasmic reticulum molecular chaperones needed for the correct folding and assembly of the trimeric MARCO molecule.

© 2006 Elsevier Inc. All rights reserved.

**Keywords:** Mouse MARCO; Lentiviral expression; Transgenic cell lines; IBL-12 mAb

The ability of the adaptive immune system to establish efficient immune responses requires the presence of organized lymphoid tissues, with a highly regulated distribution of its various stromal and hemopoietic cellular elements [1]. A substantial bulk of mobile leukocytes is continuously recirculating between various lymphoid organs, while the

sessile stromal cells and a smaller fraction of hemopoietic cells remain stationed in their tissue environment. This latter group includes various macrophage cell types and a smaller subset of B cells comprising the marginal zone (MZ) of the spleen both in human and rodents [2]. These cells capture blood-borne pathogens, and launch T-independent immune responses, or to process these antigens towards the follicles for initiating T-dependent reactions. During this communication between various splenic compartments a considerable cellular re-distribution of MZ macrophages and B cells has been demonstrated to take place, regulated by various soluble factors, including chemokines and other compounds [3].

Scavenger receptors (SRs) constitute a diverse family of cell surface molecules, comprising eight different groups of transmembrane glycoproteins [4]. These membrane receptors expressed primarily by macrophages and endothelial subsets in the lymphoreticular tissues and elsewhere recognize a broad range of foreign polyanionic ligands, such as

<sup>☆</sup> *Abbreviations:* AcLDL, acetylated low-density lipoprotein; AP, alkaline phosphatase; BSA, bovine serum albumin; cPPT sequence, central polypurine tract; FITC, fluorescein-isothiocyanate; GFP, green fluorescent protein; HRP, horseradish peroxidase; LPS, lipopolysaccharide; LTR, long terminal repeat; MAdCAM-1, mucosal addressin cell adhesion molecule-1; MARCO, macrophage receptor with collagenous structure; PBS, phosphate-buffered saline; NBT/BCIP, nitro-blue tetrazolium/bromochloro-indolyl-phosphate; SIN, self-inactivating long terminal repeat; SRCR, scavenger receptor cysteine-rich domain; TU, transforming unit; WPRE, woodchuck hepatitis virus post-transcriptional responsive element.

\* Corresponding author.

E-mail address: peter.balogh@aok.pte.hu (P. Balogh).

kvell.krisztian\_95\_23

# Transduction of CpG DNA-Stimulated Primary Human B Cells with Bicistronic Lentivectors

Krisztian Kvell,<sup>1</sup> Tuan H. Nguyen,<sup>2</sup> Patrick Salmon,<sup>2</sup> Frédéric Glauser,<sup>1</sup>  
Christiane Werner-Favre,<sup>1</sup> Marc Barnet,<sup>1</sup> Pascal Schneider,<sup>3</sup>  
Didier Trono,<sup>2</sup> and Rudolf H. Zubler<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Division of Hematology, Department of Internal Medicine, and <sup>2</sup>Department of Genetics and Microbiology, University Hospitals, 1211 Geneva-14, Switzerland

<sup>3</sup>Department of Biochemistry, University of Lausanne, 1066 Epalinges, Switzerland

\*To whom correspondence and reprint requests should be addressed. Fax: 41 22 372 72 88. E-mail: rudolf.zubler@hcuge.ch.

Available online 11 July 2005

Recently, using HIV-1-derived lentivectors, we obtained efficient transduction of primary human B lymphocytes cocultured with murine EL-4 B5 thymoma cells, but not of isolated B cells activated by CD40 ligation. Coculture with a cell line is problematic for gene therapy applications or study of gene functions. We have now found that transduction of B cells in a system using CpG DNA was comparable to that in the EL-4 B5 system. A monocistronic vector with a CMV promoter gave  $32 \pm 4.7\%$  green fluorescent protein (GFP)<sup>+</sup> cells. A bicistronic vector, encoding IL-4 and GFP in the first and second cistrons, respectively, gave  $14.2 \pm 2.1\%$  GFP<sup>+</sup> cells and IL-4 secretion of  $1.3 \pm 0.2$  ng/10<sup>5</sup> B cells/24 h. This was similar to results obtained in CD34<sup>+</sup> cells using the elongation factor-1 $\alpha$  promoter. Activated memory and naive B cells were transducible. After transduction with a bicistronic vector encoding a viral FLIP molecule, vFLIP was detectable by FACS or Western blot in GFP<sup>+</sup>, but not in GFP<sup>-</sup>, B cells, and 57% of sorted GFP<sup>+</sup> B cells were protected against Fas ligand-induced cell death. This system should be useful for gene function research in primary B cells and development of gene therapies.

**Key Words:** HIV-1-derived lentivectors, bicistronic vectors, human primary B lymphocytes, CpG DNA, viral FLIP

## INTRODUCTION

Optimization of methods for gene delivery into primary human cells is important for research on gene functions and development of gene therapies [1]. Gene transfer into primary human B lymphocytes has been notoriously difficult. Successful applications of nonviral methods to functional assays of transgenes have not been reported for these cells. Epstein-Barr virus vectors so far have been tested only in B cell lines [2]. Murine oncoretroviral vectors gave low transduction efficiency (of up to about 4%) in primary human B cells; they could be utilized to study effects detectable by very sensitive methods, such as immunoglobulin (Ig) class-switch recombination detectable by PCR [3]. HIV-1-derived lentivectors gave efficient transduction of various immature and mature human hematopoietic cells [4–6]. Transgene expression restricted to B lymphocytes was obtained by grafting lentivector-transduced CD34<sup>+</sup> progenitors into NOD/SCID mice [7]. T lymphocytes could be transduced after activation, at least from the G0 to the G1 stage of the cell cycle [5,6]. But primary human B cells activated into

proliferation by crosslinking of CD40 in the presence of various cytokines were very poorly transducible [8,9]. Recently with such vectors we obtained efficient transduction of primary B cells cocultured with irradiated murine EL-4 B5 thymoma cells; monocistronic vectors with the human cytomegalovirus (CMV) or elongation factor-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ ) internal promoter gave  $27 \pm 12\%$  green fluorescent protein (GFP)<sup>+</sup> cells [9].

For gene therapy applications, however, a cell line potentially adds risks, such as generation of recombinant viruses. For studies of gene functions a handicap is that the functions of the thymoma cells have not yet been molecularly characterized. The first aim of this study was to find a culture system for transduction with HIV vectors of isolated B cells activated by defined stimuli. The LPS receptor, Toll-like receptor-4 (TLR4), is lacking in human B cells. But TLR9, the endosomal receptor for bacterial DNA (short single-stranded DNA containing nonmethylated CpG motifs; CpG DNA), is constitutively expressed in memory human B cells and rapidly upregulated by anti-Ig antibody—which mimics an antigen signal—in

kvell.krisztian\_95\_23

## Efficient transduction of primary human B lymphocytes and nondividing myeloma B cells with HIV-1–derived lentiviral vectors

Fabrice Bovia, Patrick Salmon, Thomas Matthes, Krisztian Kvell, Tuan H. Nguyen, Christiane Werner-Favre, Marc Barnet, Monika Nagy, Florence Leuba, Jean-François Arrighi, Vincent Piguët, Didier Trono, and Rudolf H. Zubler

We studied the transduction of primary human B lymphocytes and myeloma cells with lentiviral vectors. In peripheral blood B cells that had been activated with helper T cells (murine thymoma EL-4 B5) and cytokines, multiply attenuated HIV-1–derived vectors pseudotyped with vesicular stomatitis virus (VSV) G-envelope protein achieved the expression of green fluorescence protein (GFP) in  $27\% \pm 12\%$  (mean  $\pm 1$  SD; median, 27%) of B cells in different experiments. When compared in parallel cultures, the transducibility of B cells from different donors exhibited little variation. The human cytomegalovirus

(CMV) promoter gave 4- to 6-fold higher GFP expression than did the human elongation factor-1 $\alpha$  promoter. A murine retroviral vector pseudotyped with VSV G protein proved inefficient even in mitotically active primary B cells. B cells freshly stimulated with Epstein-Barr virus were also transducible by HIV vectors ( $24\% \pm 9\%$ ), but B cells activated with CD40 ligand and cytokines resisted transduction. Thus, different culture systems gave different results. Freshly isolated, nondividing myeloma cells were efficiently transduced by HIV vectors; for 6 myelomas the range was 14% to 77% (median,

28%) GFP<sup>+</sup> cells. HIV vectors with a mutant integrase led to no significant GFP signal in primary B or myeloma cells, suggesting that vector integration was required for high transduction. In conclusion, HIV vectors are promising tools for studies of gene functions in primary human B cells and myeloma cells for the purposes of research and the development of gene therapies. (*Blood*. 2003;101:1727-1733)

© 2003 by The American Society of Hematology

### Introduction

Efficient delivery of genes into primary human B lymphocytes would allow the investigation of gene functions in these cells for the purposes of research and the development of gene therapies. One could then test in mature B cells the promoters/genes potentially suitable for stem cell–based therapies for immunodeficiencies.<sup>1</sup> Vectors achieving the efficient transfection of primary B cells would most likely also be suitable for the delivery of genes into freshly collected B tumor cells—for example, for the development of immune-based anti–B-tumor therapies.<sup>2</sup> Various viral vectors are currently being studied for their ability to transduce hematopoietic cells.<sup>3-5</sup>

Retroviral vectors derived from murine leukemia virus (MLV)<sup>6,7</sup> can transfer genes into immortal human B-cell lines, such as lymphoblastoid cells,<sup>8</sup> and primary B precursors,<sup>9</sup> but they are inefficient for mature human B cells.<sup>10,11</sup> These simple retroviruses can transduce genes only into actively dividing cells,<sup>12</sup> but a potent T-independent mitogen for human B cells in vitro, such as lipopolysaccharide (LPS) for murine B cells, has not been found.<sup>13</sup> In addition, MLV vectors might not be well adapted for human B cells because of the host species difference. HIV-1 and HIV-derived pseudotyped lentiviral vectors efficiently integrate into human cells, irrespective of cell division.<sup>14-22</sup> High transgene expression

from such vectors in human T cells or total lymphocytes has been reported.<sup>23-25</sup> Generally, productive HIV infection or lentivector-mediated transduction of truly quiescent lymphocytes has not been observed; activation, at least from G<sub>0</sub> to G<sub>1</sub>, seems to be required.<sup>23,25-28</sup> Efficient transduction of primary acute lymphoblastic leukemia cells with a bicistronic HIV vector, leading to the expression of a cytokine (granulocyte macrophage–colony-stimulating factor [GM-CSF]) and an immunostimulatory molecule (CD80), has also been achieved,<sup>29</sup> indicating a potential use of such vectors in novel anti–B-tumor therapies.

In this study we investigated the transduction of peripheral blood B cells with multiply attenuated HIV vectors pseudotyped with vesicular stomatitis virus (VSV) G glycoprotein.<sup>21</sup> Efficient transduction of such B cells occurred after their activation in a culture system using murine EL-4 B5 thymoma cells as helper T cells in conjunction with human cytokines.<sup>30-33</sup> This system leads to proliferation and subsequent plasmocytic differentiation of all naive and memory human B subsets.<sup>33</sup> Nondividing, freshly isolated multiple myeloma cells were also efficiently transduced by HIV vector. By contrast, an MLV vector pseudotyped with VSV G protein was inefficient even in dividing B cells.

From the Division of Hematology, Department of Medicine, Department of Genetics and Microbiology, and Department of Dermatology, University Hospital, Geneva, Switzerland.

Submitted December 14, 2001; accepted October 7, 2002. Prepublished online as *Blood* First Edition Paper, October 24, 2002; DOI 10.1182/blood-2001-12-0249.

Supported by grants from the Swiss National Science Foundation (D.T., R.H.Z.), the European Community, and the Clayton Institute (D.T.).

F.B. and P.S. contributed equally to this work.

D.T. has declared a financial interest as consultant to Cell Genesis, a company whose potential product is related to the HIV-1 vectors used in this study.

**Reprints:** R. Zubler, Division of Hematology, University Hospital, 1211 Geneva-14, Switzerland; e-mail: rudolf.zubler@hcuge.ch.

The publication costs of this article were defrayed in part by page charge payment. Therefore, and solely to indicate this fact, this article is hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. section 1734.

© 2003 by The American Society of Hematology

kvell.krisztian\_95\_23



AZ ÉRTEKEZÉSHEZ FELHASZNÁLT KÖNYVFEJEZETEK

kvell.krisztian\_95\_23

## Chapter

# Thymic Senescence

*Krisztian Kvell*

## Abstract

Thymic senescence develops in every person, although at different pace. Thymic senescence significantly lowers the production of naive T cells, leading to increased incidence of infections, cancer and autoimmune diseases. Certain external factors can accelerate thymic senescence. These include chemicals (copper-chelators), hormones (androgens), infections (viruses, fungi, protozoa). Others may slow the aging process of the thymus including perturbations to the hormonal (sex-steroid) system, genetic alterations (PPARgamma deficiency) or chemical compounds (PPARgamma antagonists). Thymic senescence research may provide insight to underlying molecular events and potentially appoint novel therapeutic targets for senescence intervention strategies. These hold promise to postpone thymus senescence and enhance T cell production. That would result in a decreased incidence of infections, cancer and autoimmune diseases, currently affecting the elderly. The attributed drop in health-care costs and gain in quality of life share tremendous economic and social interest.

**Keywords:** thymus, senescence, adipose tissue

## 1. The aging thymus

Transcription factor TBX-1 is a mastermind in the formation of the third pharyngeal pouch involved in thymus organogenesis during embryonic development [1]. Patients with 22q11.2DS that impairs TBX-1 often present thymus hypoplasia. Similarly, *Tbx-1<sup>null</sup>* mice develop hypoplasia of the thymus [2, 3]. In both cases, defective thymus organogenesis leads to impaired thymocyte development [4]. However, as reported recently, the role of TBX-1 in thymus organogenesis is not straightforward. Ectopic forced expression of TBX-1 can inhibit transcription factor FoxN1, the mastermind of thymic epithelial identity thus indirectly impair thymus identity via sustained presence [5]. The thymus contains developing T cells (aka thymocytes) along with the non-lymphoid thymic stromal elements comprising the microenvironment that promotes thymocyte differentiation. Stromal elements include thymic epithelial cells (aka TECs), mesenchymal cells, endothelial cells as well as non-lymphoid hematopoietic cells (e.g., dendritic cells or macrophages). TECs constitute the main functional stromal cell type necessary to promote thymocyte differentiation [6, 7]. Soon after birth the thymus expands to increase the output of naive T cells, in order to colonize available niches in the periphery [8–10]. Cortical TECs (aka cTECs) are required for T lineage commitment, along with thymocyte expansion and differentiation, and positive selection. Medullary TECs (mTECs) are necessary for the induction of central tolerance and subsequent stages of thymocyte maturation before leaving the thymus. Of note, in order to maintain the well organized cortical and medullary compartments active (reverse) intercellular signaling is also required from developing thymocytes towards TECs

kvell.krisztian\_95\_23

# Immunosenescence and the Ageing Lung

6  
2

Krisztian Kvell and Judit E. Pongracz

3

## Abstract

4

Ageing is generally defined as the progressive decline of homeostasis that occurs after the reproductive phase of life is complete and the “*soma becomes disposable*” and death is inevitable according to one theory of ageing. The complexity of the ageing process becomes strikingly evident in the lung where tissue maintenance and repair suffer from damage at the genetic level as well as tissue level. Moreover, lung function declines steadily in adulthood and if data for older adults are extrapolated, the outcome suggests an upper age limit beyond which life becomes impossible. In this review we cover the main changes to lung structure and function with age and the impact on respiratory health. We also describe the role that an aged immune system may play in the age-related decline in lung function and the major involvement of altered signalling through developmental pathways with special focus on PPAR $\gamma$ .

## Keywords

17

Lung function • Inflammation • PPAR $\gamma$  • Wnt • Ageing

18

## 6.1 Introduction

19

In a recent article [1] the association of age with lung function decline was summarized and showed a linear decline from maturity. If trajectories depicted in the paper are extrapolated (Fig. 6.1), it becomes evident that the absolute extent of human life is limited, at least in part, by respiratory function to about 130 years but currently there are no confirmed cases available of people who lived to the absolute limit of pulmonary functional decline. A rare exception is Mrs Tuti Yusupova of Uzbekistan who died in 2014 apparently at the age of 134 [2]. Although caution is

---

K. Kvell • J.E. Pongracz (✉)

Department of Pharmaceutical Biotechnology, School of Pharmacy, and Szentagotthai Research Center, University of Pecs, 2 Rokos Str, Pecs 7624, Hungary  
e-mail: [pongacz.e.judit@pte.hu](mailto:pongacz.e.judit@pte.hu)

© Springer International Publishing Switzerland 2017

V. Bueno et al. (eds.), *The Ageing Immune System and Health*,  
DOI 10.1007/978-3-319-43365-3\_6

kvell.krisztian\_95\_23

# Central Immune Senescence, Reversal Potentials

Krisztian Kvell and Judit E. Pongracz  
*Department of Medical Biotechnology, University of Pecs,  
Hungary*

## 1. Introduction

### 1.1 Ageing in focus

Ageing is a complex process that affects all living organisms. Senescence is not only conceivable in multicellular organisms, but also in unicellulars. Unlike certain diseases that have specific morbidity rates, ageing is a physiological process that affects all individuals that live long enough (unaffected by i.e. predation or famine) to experience senescence.

A pioneer of ageing research, August Weismann has established two rather opposing concepts for aging and even today both gather numerous followers. One is the adaptive concept, according to which ageing has evolved to cleanse the population from old, non-reproductive consumers. The other, non-adaptive concept suggests that ageing is due to greater weight on early survival / reproduction rather than vigour at later ages. This latter has been reshaped by the theory of antagonistic pleiotropy (Ljubuncic et al. 2009).

Due to advances in biomedical research and care, currently an average 55-aged person is expected to live up to 85 years of age at death on average in the Western societies. This number is expected to increase if biomedical research continues to develop at the current rate and by the year 2030 an average 55-aged person is expected to live up to 115 years of age at death (according to SENS plans) (de Grey 2007). If such forecasts prove to be true, it is of extraordinary significance and will likely trigger immense social and economical conflicts.

#### 1.1.1 Ageing and society

Ageing of the population is one of the most important challenges for the developed world to face over the next decades. The current demographic trends and consequent shrinkage of the active workforce will put enormous pressure on the financing of social protection and health systems, likely to reduce living standards. Taken together with increased migration and emergence of novel infectious diseases, broad-scale provision of immunological protection constitutes a strategic aim for longer and healthier lifespan.

At present life-span is still significantly increasing in the Western civilisations, however, this increase is not accompanied by proportional increase in life spent in overall good health referred to as 'health-span'. There are current efforts to prolong health-span within expanding life-span. This would not only extend life spent in appropriate quality of life, but

kvell.krisztian\_95\_23



KIEMELKEDŐ HIVATKOZOTTSÁGI SZÁMÚ PUBLIKÁCIÓK

kvell.krisztian\_95\_23

# Wnt4 and LAP2alpha as Pacemakers of Thymic Epithelial Senescence

Krisztian Kvell<sup>1</sup>, Zoltan Varecza<sup>1</sup>, Domokos Bartis<sup>1</sup>, Sebastian Hesse<sup>1</sup>, Sonia Parnell<sup>2</sup>, Graham Anderson<sup>2</sup>, Eric J. Jenkinson<sup>2</sup>, Judit E. Pongracz<sup>1,2\*</sup>

**1** Department of Medical Biotechnology, Institute for Immunology and Biotechnology, University of Pecs, Pecs, Hungary, **2** Division of Immunity and Infection, Department of Anatomy, Institute for Biomedical Research, University of Birmingham, Birmingham, United Kingdom

## Abstract

Age-associated thymic involution has considerable physiological impact by inhibiting *de novo* T-cell selection. This impaired T-cell production leads to weakened immune responses. Yet the molecular mechanisms of thymic stromal adipose involution are not clear. Age-related alterations also occur in the murine thymus providing an excellent model system. In the present work structural and molecular changes of the murine thymic stroma were investigated during aging. We show that thymic epithelial senescence correlates with significant destruction of epithelial network followed by adipose involution. We also show in purified thymic epithelial cells the age-related down-regulation of Wnt4 (and subsequently FoxN1), and the prominent increase in LAP2 $\alpha$  expression. These senescence-related changes of gene expression are strikingly similar to those observed during mesenchymal to pre-adipocyte differentiation of fibroblast cells suggesting similar molecular background in epithelial cells. For molecular level proof-of-principle stable LAP2 $\alpha$  and Wnt4-over-expressing thymic epithelial cell lines were established. LAP2 $\alpha$  over-expression provoked a surge of PPAR $\gamma$  expression, a transcription factor expressed in pre-adipocytes. In contrast, additional Wnt4 decreased the mRNA level of ADRP, a target gene of PPAR $\gamma$ . Murine embryonic thymic lobes have also been transfected with LAP2 $\alpha$ - or Wnt4-encoding lentiviral vectors. As expected LAP2 $\alpha$  over-expression increased, while additional Wnt4 secretion suppressed PPAR $\gamma$  expression. Based on these pioneer experiments we propose that decreased Wnt activity and increased LAP2 $\alpha$  expression provide the molecular basis during thymic senescence. We suggest that these molecular changes trigger thymic epithelial senescence accompanied by adipose involution. This process may either occur directly where epithelium can trans-differentiate into pre-adipocytes; or indirectly where first epithelial to mesenchymal transition (EMT) occurs followed by subsequent pre-adipocyte differentiation. The latter version fits better with literature data and is supported by the observed histological and molecular level changes.

**Citation:** Kvell K, Varecza Z, Bartis D, Hesse S, Parnell S, et al. (2010) Wnt4 and LAP2alpha as Pacemakers of Thymic Epithelial Senescence. PLoS ONE 5(5): e10701. doi:10.1371/journal.pone.0010701

**Editor:** Immo A. Hansen, New Mexico State University, United States of America

**Received:** February 4, 2010; **Accepted:** April 27, 2010; **Published:** May 18, 2010

**Copyright:** © 2010 Kvell et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Funding:** Research was supported by the following grants: The Wellcome Trust grant No.: 079415 (grant-holders: J.E.P., G.A. and E.J.J.), 'Science Please' Research Team on Innovation grant No.: SROP-4.2.2/08/1/2008-0011 (grant holder: J.E.P.) and OTKA (Hungarian Scientific Research Fund) type: PD (post-doctoral) grant No.: 78310 (grant-holder: K.K.). The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

**Competing Interests:** The authors have declared that no competing interests exist.

\* E-mail: judit.e.pongracz@aok.pte.hu

## Introduction

### Thymic senescence

Thymic senescence begins early, around late puberty. This process is called adipose involution, as the thymus is invaded by adipose tissue [1]. Due to decrease in thymic epithelial tissue mass, the thymus can no longer support the same output of T-cell production [2]. Therefore peripheral blood T lymphocyte composition exhibits the dominance of memory T lymphocytes resulting in impaired responses towards novel, particularly viral infections [3,4,5]. Since the thymic epithelium has a key role in deleting auto-reactive T-cell clones, functional impairment increases the chances of developing auto-immune disease [6]. If we were able to slow down or even stop the loss of thymic epithelium the elderly would have a better chance to address late-onset autoimmune diseases and viral infections. However, despite studies of thymic senescence, the molecular mechanism of thymic aging remains elusive.

### Signaling pathways of thymic epithelial cell development and maintenance

Understanding signaling mechanisms that regulate tissue development and maintenance of thymic epithelial cells might reveal the process of adipose involution. Certainly, maintenance and functional integrity of the thymic stroma requires stimuli through Notch, BMP, and Wnt signaling pathways [7,8,9,10,11]. Undoubtedly, the Wnt family of secreted glycoproteins is one of the best analyzed among the required ligands [12]. Most members of the nineteen known Wnt glycoproteins have been implicated in both the development of embryonic thymus and the maintenance of adult thymic epithelium [13]. In the thymus, Wnt ligands originate primarily from thymic epithelial cells and activate a highly complex signaling network via ten G-protein dependent receptors called Frizzleds (Fz), and their co-receptors of low-density lipoprotein receptor-related proteins 5/6 called LRP5/6 [14,15]. The actual constellation of ligands, receptors, co-receptors and further regulatory molecules define Wnt-mediated effects.

Recent studies have highlighted Wnt4 as responsible for the direct up-regulation of FoxN1, a key transcription factor responsible for the differentiation of thymic epithelial cells and the subsequent maintenance of thymic epithelial identity [13]. Interestingly, the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway is known to efficiently block the adipocyte differentiation program in mesenchymal elements like fibroblasts [16,17,18,19].

### Trans-differentiation of fibroblasts into adipocytes

Studies with fibroblast cells have also revealed that fibroblast to pre-adipocyte transformation is strongly connected to LAP2 $\alpha$ , the member of the LAP2 protein family [17]. To date there are 7 classified intranuclear LAP2 polypeptides marked by the Greek alphabet. They are all splice variants of the same LAP2 gene previously called thymopoietin. While most splice variants associate with the nuclear envelope, LAP2 $\alpha$  is involved in several nucleoplasmic activities including cell-cycle control and differentiation [20,21]. LAP2 $\alpha$  is synthesized in the cytoplasm and is then transported into the nucleus by a PKC-dependent mechanism [22]. The mere over-expression of LAP2 $\alpha$  in fibroblasts is known to directly up-regulate PPAR $\gamma$  expression, an acknowledged marker and key transcription factor of pre-adipocyte differentiation [17]. In pre-adipocytes PPAR $\gamma$  expression is followed by an increase of ADRP expression (adipose differentiation-related protein) a known direct target gene of PPAR $\gamma$ . Although LAP2 $\alpha$

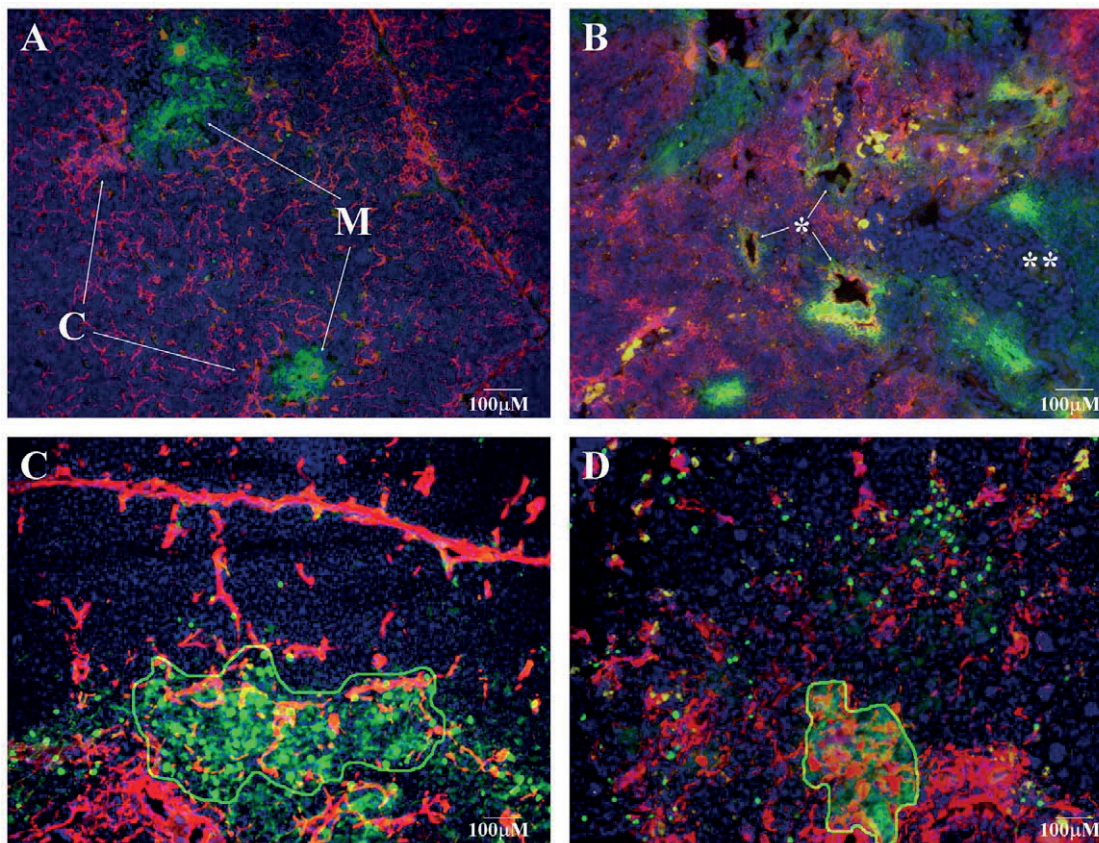
over-expression alone initiates pre-adipocyte differentiation in fibroblasts, it is not sufficient to complete the adipocyte differentiation program in the absence of additional stimuli [17].

## Results and Discussion

### Disintegration of epithelial network

Senescence exhibits characteristic histological changes in both the human and mouse thymus [1,23]. In order to demonstrate this process the thymic lobes of 1 month and 1 year old BALB/c mice were analyzed (see Figures 1A and 1B). In young adult mice, histology revealed strict segregation of epithelial cell compartments by staining for medullary (EpCAM1<sup>++</sup>, Ly51<sup>-</sup>) and cortical (EpCAM1<sup>+</sup>, Ly51<sup>++</sup>) epithelial cellular subsets (Figure 1A). This shows high level of morphological integrity just preceding puberty/early adulthood. However, the highly organized structure disintegrates and becomes chaotic by the age of 1 year (Figure 1B). By this age the previously shown strict cortico-medullary delineation becomes disintegrated, degenerative vacuoles appear surrounded by areas showing strong co-staining with both epithelial markers. There are also other large cellular areas that lack staining with either epithelial marker, a pattern completely absent at the young adult age.

Staining of extracellular matrix components of fibroblast origin (ER-TR7<sup>++</sup>) was also performed on cryostat thymic sections of 2



**Figure 1. Disintegration of epithelial network.** Figure 1A demonstrates cryostat section of 1 month, whereas figure 1B presents cryostat section of 1 year old BALB/c mouse thymus. Staining pattern: anti-EpCAM1-FITC (green), anti-Ly51-PE (red), DAPI (blue). 'M' marks medullary (EpCAM1<sup>++</sup>, Ly51<sup>-</sup>), while 'C' marks cortical (EpCAM1<sup>+</sup>, Ly51<sup>++</sup>) epithelial compartments on Figure 1A. Single asterisk (\*) marks degenerative vacuoles, while double asterisk (\*\*) mark the loss of epithelial staining on Figure 1B. Figure 1C (lower left) shows cryostate section of 2 month, whereas figure 1D (lower right) demonstrates cryostate section of 9 month old BALB/c mouse thymus. Staining pattern: anti-EpCAM1-FITC, ER-TR7-PE, DAPI (blue). The EpCAM1<sup>++</sup> thymic medulla is outlined by continuous line on Figures 1C and 1D for easier visualization.

doi:10.1371/journal.pone.0010701.g001

month and 9 month old BALB/c mice to identify epithelial and mesenchymal elements in young adult and aging thymic lobes. The above ages were selected to check additional time points and more precisely map the timeframe of thymic physiological senescence (see Figures 1C and 1D). The staining patterns are strikingly different at the two ages examined. In the 2 month old thymic tissue section a-EpCAM1 and ER-TR7-staining show little tendency for colocalization. In stark contrast, by the age of 9 months a-EpCAM1 and ER-TR7-staining show significant overlap within the thymic medulla, a phenomenon completely absent at earlier ages.

### Adipose involution

To demonstrate how the disorganization of thymic epithelial network is followed by the emergence of adipocytes, thymic sections of 1.5 year old GFP-transgenic BALB/c mice were analyzed. This mouse strain develops and reproduces exactly like control BALB/c mice, and the thymic epithelial function and thymocyte maturation is indistinguishable from wild type controls [24]. However, due to the ubiquitous and strong EF1 promoter-driven transgene transcription, bright GFP expression offers a native, green-colored, cytoplasmic staining for all the cells in these mice. Thymic sections of senescent GFP-transgenic mice were co-stained with LipidTox Red to identify adipocytes. Histology shows the presence of relatively large, inflated cells in which the green-colored (GFP-containing) cytoplasm is pushed to the periphery by red-staining neutral lipid deposits, a pattern characteristic of adipose cells (see Figure 2).

### Molecular changes of thymic epithelium

Having presented structural changes of thymic epithelial senescence, we set out to investigate the underlying molecular events. In order to detect gene expression changes, thymic epithelial cells were purified from 1 month and 1 year old BALB/c mice based on EpCAM1 expression (MACS separation). Following cDNA synthesis, quantitative RT-PCR analysis was performed. Several genes including Wnt4, FoxN1, PPAR $\gamma$ , ADRP, lamin1 and LAP2 $\alpha$  were tested (Table 1 lists primer sequences and characteristics, see Figures 3A–D for changes in gene expression). Figure 3A shows that the expression of both Wnt4 and FoxN1 decreases in thymic epithelial cells. Highly decreased level (or total absence in some cases) of FoxN1 could be

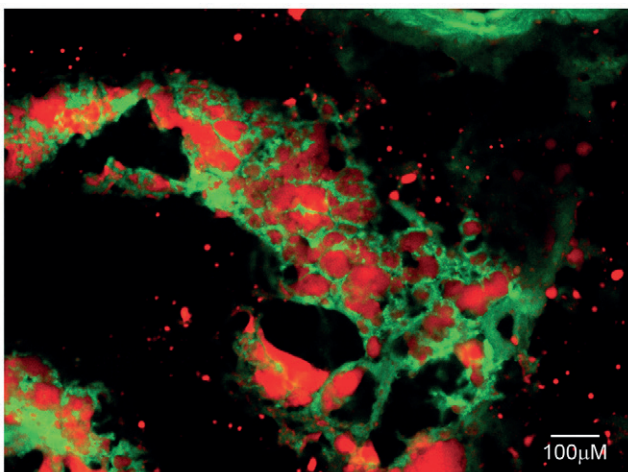
the consequence of strong Wnt4 down-regulation by the age of 1 year, indicating that thymic epithelial cells can down-regulate FoxN1 expression while maintaining that of epithelial cell surface markers like EpCAM1 [13]. At the same time, mRNA levels of pre-adipocyte differentiation markers PPAR $\gamma$  and ADRP rise with age in the same, EpCAM1-positive cell population (Figure 3C). This finding is in harmony with histological data demonstrating the emergence of adipocytes in the thymic lobes of senescent mice (Figure 2). The expression of lamin1, a key component of the nuclear lamina remains unaffected during senescence in thymic epithelial cells; whereas, the expression of LAP2 $\alpha$  increases significantly (see Figure 3B). This degree of dissociation between lamin1 and LAP2 $\alpha$  expression is of note and suggests functional differences despite conventionally anticipated association of lamin1 and LAP2 molecular family members. The measured LAP2 $\alpha$  up-regulation associated with age-related adipose involution is, however, in perfect agreement with other literature data suggesting the pre-adipocyte differentiation-promoting effect of LAP2 $\alpha$  in fibroblasts [17]. This is the first report to show that such, normally fibroblast associated molecular changes occur in purified thymic epithelial cells. In the literature, epithelial-mesenchymal transition is associated with differential expression of E- and N-cadherin [25]. While E-cadherin decreases, N-cadherin normally compensates for the loss of E-cadherin expression. To investigate whether the first step towards pre-adipocyte differentiation is the epithelial-mesenchymal transition of epithelial cells, gene expression changes of E-cadherin and N-cadherin were measured (Figure 3D). While E-cadherin mRNA levels significantly decreased, N-cadherin gene expression showed a slight increase, indicating that EMT might be the initial step in epithelial cell transition to become pre-adipocytes.

### Transgenic cell lines

Stable LAP2 $\alpha$  over-expressing or Wnt4-secreting transgenic TEPI cell lines were established using lentiviral transgenesis. The use of a primary-derived model cell line provides the advantage of absolute purity, the complete lack of other cell types that could potentially affect the gene expression profile of epithelial cells [26]. The established transgenic cell lines proliferated normally and did not show obvious signs of phenotypic changes (data not shown). In contrast to morphology, quantitative RT-PCR analysis revealed that LAP2 $\alpha$  over-expression triggers an immense surge of PPAR $\gamma$  expression (Figure 4). Such an increase in mRNA level suggests that this is not a plain quantitative, but rather a qualitative change. ADRP a direct target gene of PPAR $\gamma$  was also up-regulated albeit to a lesser extent (Figure 4). On the other hand in Wnt4-secreting TEPI cells the mRNA level of both PPAR $\gamma$  and ADRP was decreased (Figure 4). In the TEPI cell line the expression of FoxN1 could not be addressed as it is very low/undetectable and remains as such with all the tested treatments (data not shown).

### Transfected embryonic thymic organ cultures

To confirm the involvement of LAP2 $\alpha$  and Wnt4 during adipogenesis through their direct effect on PPAR $\gamma$  expression in primary cells, murine thymic lobes were isolated from timed pregnancies at E12. Thymic lobes at the age of E12 provide an excellent experimental setting where the thymus has just been formed and there is no sign of aging. Furthermore, thymic lobes at this stage are also small enough to be both cultured and transfected as a whole, nutrients and virions have free access to most of the cells in the lobe without the need of disrupting any intercellular connection or tissue matrix [8,27]. The isolated lobes were therefore transfected with lentiviral vectors encoding GFP (mock), Wnt4 or LAP2 $\alpha$  and were cultured for 4 days *in vitro*. Q-PCR was



**Figure 2. Adipose involution.** Figure 2 shows adipose involution over cryostat section of 1.5 year old GFP-transgenic BALB/c mouse thymus. Staining pattern: GFP (green), LipidTox Red (red). doi:10.1371/journal.pone.0010701.g002

**Table 1.** List of gene specific PCR primers.

Gene	Forward primer	Reverse primer
<b><math>\beta</math>-actin</b>	5'-TGG CGC TTT TGA CTC AGG A -3'	5'-GGG AGG GTG AGG GAC TTC C - 3'
<b>Wnt4</b>	5'-CTC AAA GGC CTG ATC CAG AG - 3'	5'-TCA CAG CCA CAC TTC TCC AG - 3'
<b>LAP2<math>\alpha</math></b>	5'-TGA ACT GCA GGC AGC TAA GA-3'	5'-TCA TAG CTA GAC TCT GAG G-3'
<b>Lamin1</b>	5' - TGA GTA CAA CCT GCG CTC AC -3'	5' - TGA CTA GGT TGT CCC CGA AG -3'
<b>PPAR<math>\gamma</math></b>	5' - CCC AAT GGT TGC TGA TTA CAA A -3'	5' - AAT AAT AAG GTG GAG ATG CAG GTT CT -3'
<b>ADRP</b>	5' - CGC CAT CGG ACA CTT CCT TA -3'	5' - GTG ATG GCA GGC GAC ATC T -3'
<b>E-cadherin</b>	5'- AAG TGA CCG ATG ATG ATG CC -3'	5'- CTT CAT TCA CGT CTA CCA CGT -3'
<b>N-cadherin</b>	5' - GTG GAG GCT TCT GGT GAA AT - 3'	5' - CTG CTG GCT CGC TGC TT - 3'
<b>FoxN1</b>	Applied Biosystems TaqMan probe PN4351272 (Mm00477457_m1)	

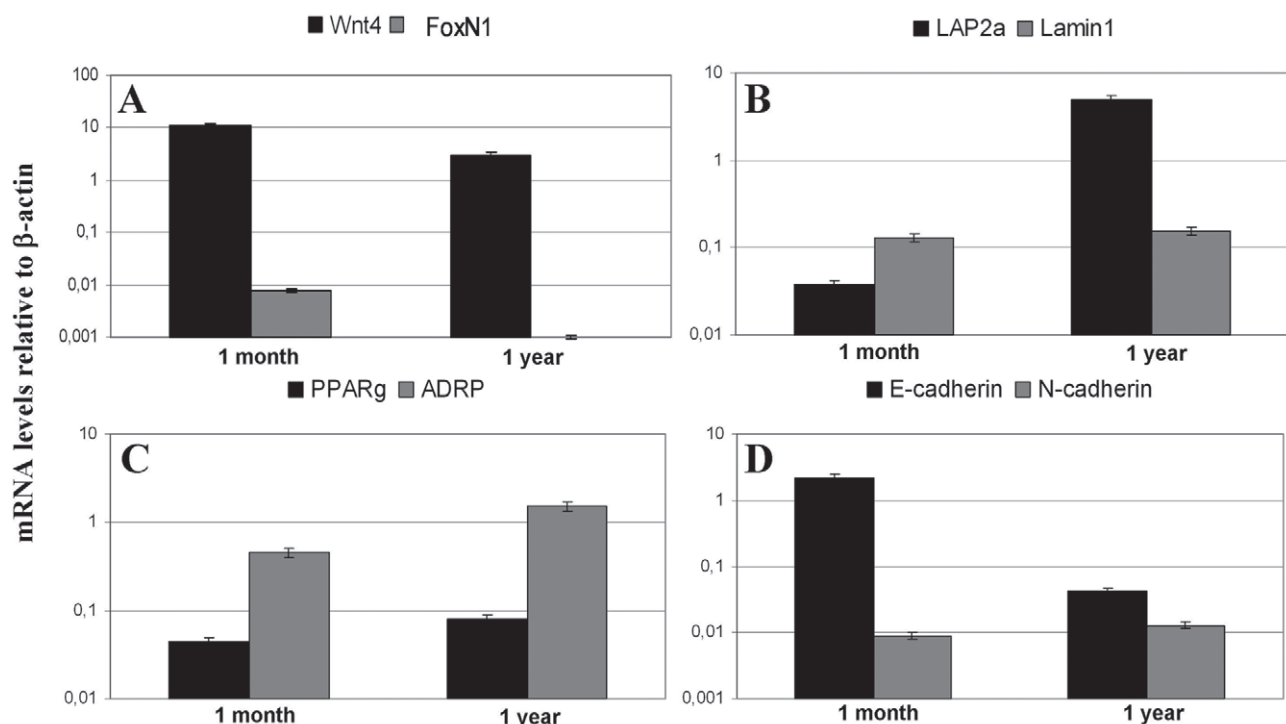
doi:10.1371/journal.pone.0010701.t001

performed to confirm over-expression of LAP2 $\alpha$  and Wnt4 in the embryonic thymic lobes as a result of lentiviral transgenesis (Figure 5A) and their effect on PPAR $\gamma$  expression was also analyzed (Figure 5B). The level of over-expression was confirmed following transfection with both LAP2 $\alpha$ - and Wnt4-encoding viral vectors. Q-PCR analysis revealed that LAP2 $\alpha$  over-expression triggers an increase of PPAR $\gamma$  expression, whereas additional Wnt4 secretion suppresses PPAR $\gamma$  level (Figure 5B). The latter Wnt4-mediated suppression of PPAR $\gamma$  expression in cultures of E12 thymic embryonic lobes was also confirmed by treatment with Wnt4-containing supernatants of Wnt4 over-expressing TEP1 cell line (data not shown). Interestingly, the expression of FoxN1 did not decrease in LAP2 $\alpha$  over-expressing thymic lobes (data not shown), possibly due to high levels of Wnt4 in the embryonic

thymic tissue preserving FoxN1 status. Our molecular studies using E12 thymic lobes confirmed our data obtained with the TEP1 cell lines, that even in embryonic thymic tissue pre-adipocyte differentiation markers can be up-regulated in the presence of LAP2 $\alpha$ , indicating that the process can be dissected and controlled at a molecular level.

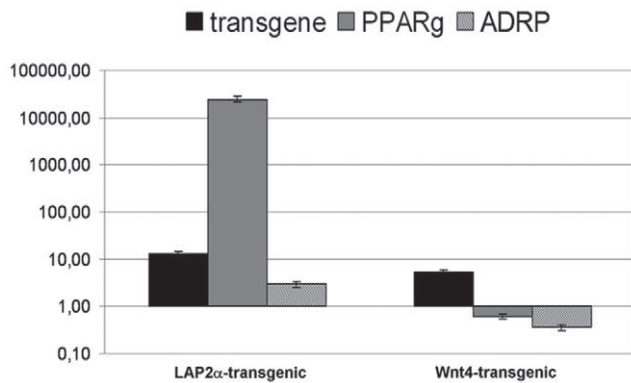
### Conclusion

Here we show that with senescence, thymic epithelial Wnt4 secretion decreases, possibly below a threshold level that is required to maintain the identity of established thymic epithelial cells. This is measured by the loss of FoxN1 expression, a key transcription factor defining thymic epithelial cell identity. However, these epithelial cells still express cell surface markers



**Figure 3. Molecular changes in thymic epithelium.** Figures 3A–D demonstrate gene expression changes of MACS purified thymic epithelial cells measured by Q-PCR. Please note that the Y-axis scale is logarithmic. Error bars show  $\pm 1$  SD.

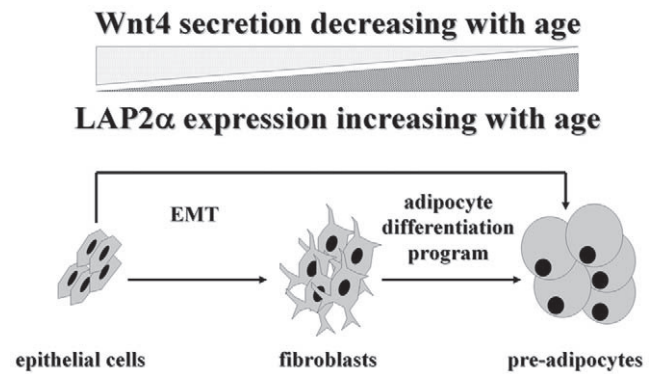
doi:10.1371/journal.pone.0010701.g003



**Figure 4. Confirmation in transgenic thymic cell lines.** Figure 4 shows gene expression changes of LAP2 $\alpha$  and Wnt4 over-expressing transgenic TEP1 cells measured by Q-PCR. Please note that Y-axis scale is logarithmic. Error bars show  $\pm 1$  SD. doi:10.1371/journal.pone.0010701.g004

characteristic for thymic epithelial cells – i.e. EpCAM1. Wnt4 deprivation opens up an opportunity for trans-differentiation into pre-adipocytes. The simultaneous increase in LAP2 $\alpha$  expression provides the necessary signal that pushes de-differentiated thymic epithelial cells to differentiate into pre-adipocytes, as detected by increased mRNA levels of PPAR $\gamma$  and ADRP.

We propose two different mechanisms for the process of adipose involution (see Figure 6). The first allows for the direct initiation of pre-adipocyte differentiation from de-differentiated thymic epithelial cells due to the down-regulation of Wnt4 and up-regulation of LAP2 $\alpha$ . Although we cannot rule out this first model, we favor the second model where the process occurs indirectly: de-differentiation of thymic epithelial cells triggers EMT first, and then the resulting fibroblasts undergo the conventional route of differentiation program towards adipocyte-lineage commitment. The latter model certainly fits better with current literature of EMT [28] and is also supported by our histological and molecular results. Co-localization of a-EpCAM1 and ER-TR7-staining in the aging thymic medulla (Figure 1D) confirms that in the 9 month old thymus there are cells expressing the EpCAM1 marker as a legacy of their primary origin, and also secreting ER-TR7-positive extracellular matrix components, a function conventionally attributed to fibroblast cells. Moreover, Q-PCR data obtained with cDNA samples of MACS-purified thymic epithelial cells also



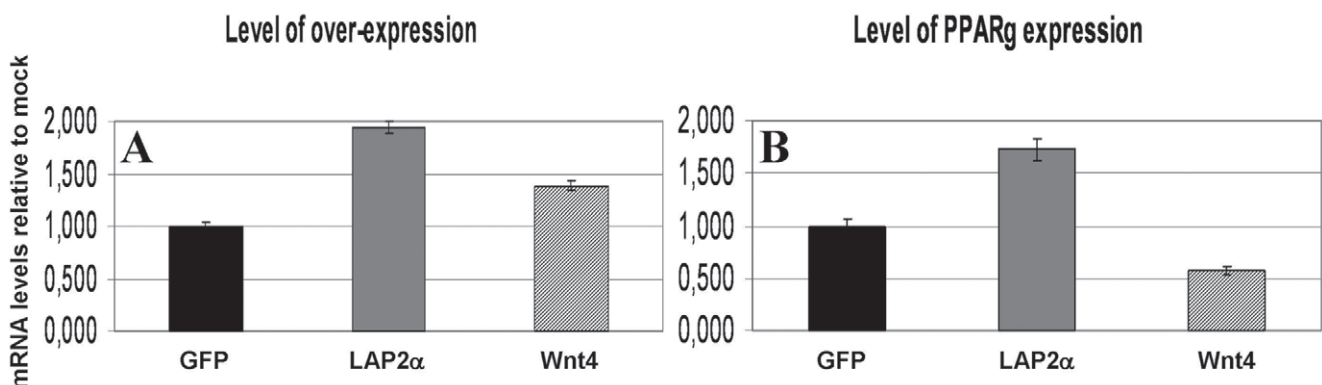
**Figure 6. Model for thymic epithelial senescence.** Figure 6 demonstrates our molecular level model of thymic adipose involution. Decreasing Wnt4 and increasing LAP2 $\alpha$  levels promote epithelial cells to differentiate into pre-adipocytes either directly or indirectly via EMT. doi:10.1371/journal.pone.0010701.g006

demonstrate an age-related shift in cadherin expression levels characteristic for EMT (Figure 3D) providing additional evidence for the active process of EMT during thymic epithelial senescence.

Our model of thymic epithelial senescence is based on data obtained with mice undergoing physiological senescence. This is the first model for the molecular basis of the thymic epithelium to undergo adipose involution. This model withstands molecular level proof-of-principle using both a model cell line and primary embryonic thymic organ cultures rendered transgenic by lentiviral transgenesis.

### Perspectives

Further experiments, however, are required. We plan using inducible, LAP2 $\alpha$ -transgenic mice to allow us precise temporal-spatial over-expression of LAP2 $\alpha$  in adult thymic epithelium to model and decisively verify the role of LAP2 $\alpha$  in pre-adipocyte trans-differentiation *in vivo* exploiting our experience in establishing transgenic animals [24,29]. If LAP2 $\alpha$  proves to be a master regulator of thymic adipose involution *in vivo* too, this knowledge appoints LAP2 $\alpha$  as target molecule for directed rejuvenation of the thymic epithelial structure and function. This rejuvenation process could theoretically reinforce naïve T-cell output to reach young adult levels that could ameliorate senescence-related immunological disorders like impaired antiviral defense and late-onset autoimmune diseases.



**Figure 5. Confirmation in transfected thymic lobes.** Figures 5A–B present gene expression changes measured by Q-PCR from cDNA of murine thymic lobes transfected at E12 and cultured for 4 days *in vitro*. Please note that Y-axis scale is linear. Error bars show  $\pm 1$  SD. doi:10.1371/journal.pone.0010701.g005

## Methods

### Cell lines and mice

The 293T (ATCC: CRL-11268) and TEPI [26] cell lines were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, penicillin, streptomycin and  $\beta$ -mercapto-ethanol (Lonza Walkersville). For the experiments we used thymic lobes from timed pregnancies at E12, and also from adult BALB/c mice at 4 week and 1 year of age, and from 1.5 year old GFP-transgenic BALB/c-mice. Mice were bred in our animal facility; all animal work has been conducted according to relevant national and international guidelines following approval of ethics committee of the University of Pecs. Senescent animals developed and aged normally, without any treatment.

### Transgenic cell, organ and animal models

The GFP-transgenic BALB/c model was created using lentiviral transgenesis as published by our group [24]. The Wnt4 sequence was purchased and subcloned from an Origene (Origene) vector containing human full-length Wnt4 cDNA. The full-length murine LAP2 $\alpha$  cDNA containing plasmid was a kind gift of Dr. Simon Amos. The GFP (mock), LAP2 $\alpha$  or Wnt4 over-expressing TEPI cell lines or E12 thymic lobes were generated using lentiviral vectors that were prepared as described previously [30]. Following overnight lentiviral transfection the thymic lobes were transferred over Nucleopore Track-Etch Membranes (Whatman) and were cultured in DMEM supplemented with 20% FCS, penicillin, streptomycin, ciprofloxacin, amphotericin-B and  $\beta$ -mercapto-ethanol (Lonza Walkersville).

### Histology using fluorescent antibodies, proteins and dyes

Sections (9  $\mu$ m) of frozen thymic lobes of BALB/c mice were fixed in cold acetone, then dried and blocked using 5% BSA in PBS for 20 min before staining with a-Ly51-PE (clone 6C3), a-EpCAM-FITC (clone G8.8), ER-TR7-PE antibodies and DAPI. Thymic sections of GFP-transgenic mice were fixed in 4% paraformaldehyde before staining with LipidTOX Red following the manufacturer's instructions (Invitrogen). The sections were analyzed using an Olympus BX61 microscope equipped with a CCD camera and AnalySIS software.

## References

- Marinova TT (2005) Epithelial framework reorganization during human thymus involution. *Gerontology* 51: 14–18.
- Ribeiro RM, Perelson AS (2007) Determining thymic output quantitatively: using models to interpret experimental T-cell receptor excision circle (TREC) data. *Immunol Rev* 216: 21–34.
- Grubeck-Loebenstein B (2009) Fading Immune Protection in Old Age: Vaccination in the Elderly. *J Comp Pathol*.
- Chidgey A, Dudakov J, Seach N, Boyd R (2007) Impact of niche aging on thymic regeneration and immune reconstitution. *Semin Immunol* 19: 331–340.
- Gui J, Zhu X, Dohkan J, Cheng L, Barnes PF, et al. (2007) The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells. *Int Immunol* 19: 1201–1211.
- Hsu HC, Mountz JD (2003) Origin of late-onset autoimmune disease. *Immunol Allergy Clin North Am* 23: 65–82, vi.
- Bleul C, Boehm T (2005) BMP signaling is required for normal thymus development. *J Immunol* 175: 5213–5221.
- Pongracz J, Hare K, Harman B, Anderson G, Jenkinson E (2003) Thymic epithelial cells provide Wnt signals. *Eur J Immunol* 33: 1949–1956.
- Osada M, Ito E, Fermin HA, Vazquez-Cintron E, Venkatesh T, et al. (2006) The Wnt signaling antagonist Kremen1 is required for development of thymic architecture. *Clin Dev Immunol* 13: 299–319.
- Kuraguchi M, Wang XP, Bronson RT, Rothenberg R, Ohene-Baah NY, et al. (2006) Adenomatous polyposis coli (APC) is required for normal development of skin and thymus. *PLoS Genet* 2: e146.
- Anderson G, Pongracz J, Parnell S, Jenkinson EJ (2001) Notch ligand-bearing thymic epithelial cells initiate and sustain Notch signaling in thymocytes independently of T cell receptor signaling. *Eur J Immunol* 31: 3349–3354.
- Mikels AJ, Nusse R (2006) Wnts as ligands: processing, secretion and reception. *Oncogene* 25: 7461–7468.
- Balciunaite G, Keller M, Balciunaite E, Piali L, Zuklys S, et al. (2002) Wnt glycoproteins regulate the expression of FoxN1, the gene defective in nude mice. *Nat Immunol* 3: 1102–1108.
- Gordon MD, Nusse R (2006) Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *J Biol Chem* 281: 22429–22433.
- Schweizer L, Varmus H (2003) Wnt/Wingless signaling through beta-catenin requires the function of both LRP/Arrow and frizzled classes of receptors. *BMC Cell Biol* 4: 4.
- Torday JS, Rehan VK (2006) Up-regulation of fetal rat lung parathyroid hormone-related protein gene regulatory network down-regulates the Sonic Hedgehog/Wnt/betacatenin gene regulatory network. *Pediatr Res* 60: 382–388.
- Dorner D, Vleck S, Foeger N, Gajewski A, Makolm C, et al. (2006) Lamina-associated polypeptide 2alpha regulates cell cycle progression and differentiation via the retinoblastoma-E2F pathway. *J Cell Biol* 173: 83–93.
- Christodoulides C, Lagathu C, Sethi JK, Vidal-Puig A (2009) Adipogenesis and WNT signalling. *Trends Endocrinol Metab* 20: 16–24.
- Moldes M, Zuo Y, Morrison RF, Silva D, Park BH, et al. (2003) Peroxisome-proliferator-activated receptor gamma suppresses Wnt/beta-catenin signalling during adipogenesis. *Biochem J* 376: 607–613.
- Berger R, Theodor L, Shoham J, Gokkel E, Brok-Simoni F, et al. (1996) The characterization and localization of the mouse thymopoietin/lamina-associated polypeptide 2 gene and its alternatively spliced products. *Genome Res* 6: 361–370.
- Hutchison CJ, Alvarez-Reyes M, Vaughan OA (2001) Lamins in disease: why do ubiquitously expressed nuclear envelope proteins give rise to tissue-specific disease phenotypes? *J Cell Sci* 114: 9–19.

### Separation and enrichment of thymic epithelial cells

Thymic lobes were digested with type F collagenase from *C. hystolyticum* (Sigma) for 30 min, then washed with DMEM 10% FCS. Cell suspensions were then labeled with anti-EpCAM1-FITC (clone G8.8) and washed with MACS-buffer followed by incubation with anti-FITC micro-beads (Miltenyi Biotec), the EpCAM<sup>+</sup>-cells were used for total RNA isolation and subsequent quantitative PCR analysis. The cells were purified using MACS LS separation columns (Miltenyi Biotec).

### RNA isolation, preparation of cDNA, Q-PCR analysis

Total RNA was isolated the RNeasy kit (Macherey-Nagel), including an on column DNA digestion step. cDNA was constructed using the high capacity RNA to cDNA kit (Applied Biosystems). For Q-PCR analysis, we used an AB7500 platform and either SYBR green or TaqMan PCR master mix (Applied Biosystems). Gene expression was normalized to  $\beta$ -actin. The sequences and data of primers are listed in Table 1.

### Statistical analysis

All experiments were performed on three occasions, representative experiments are shown. Measures were obtained in triplicates; data are presented as mean  $\pm$  1 SD by error bars.

### Acknowledgments

The supernatant of ER-TR7 hybridoma clone was originally donated by Dr. Willem van Ewijk to Dr. Peter Balogh, who provided it for the authors. The authors are grateful to Prof. S. Amos (Institute of Hematology, Chaim Sheba Medical Center, Tel-Hashomer, Israel) for providing the murine LAP2 $\alpha$  construct and Prof. E. L. Cooper (Laboratory of Comparative Neuroimmunology, Department of Neurobiology, David Geffen School of Medicine at UCLA, University of California, Los Angeles, USA) for critically and carefully reading the manuscript.

### Author Contributions

Conceived and designed the experiments: KK GA EJJ JEP. Performed the experiments: KK ZV DB SH SP. Analyzed the data: KK ZV DB SH SP GA EJJ JEP. Contributed reagents/materials/analysis tools: KK GA EJJ JEP. Wrote the paper: KK JEP.



22. Dreger M, Otto H, Neubauer G, Mann M, Hucho F (1999) Identification of phosphorylation sites in native lamina-associated polypeptide 2 beta. *Biochemistry* 38: 9426–9434.
23. Oksanen A (1971) Multilocular fat in thymuses of rats and mice associated with thymus involution: a light- and electron-microscope and histochemical study. *J Pathol* 105: 223–226.
24. Kvell K, Czompoly T, Hiripi L, Balogh P, Kobor J, et al. Characterisation of eGFP-transgenic BALB/c mouse strain established by lentiviral transgenesis. *Transgenic Res* 19: 105–112.
25. Seike M, Mizutani H, Sudoh J, Gemma A (2009) Epithelial to mesenchymal transition of lung cancer cells. *J Nippon Med Sch* 76: 181.
26. Beardsley TR, Pierschbacher M, Wetzel GD, Hays EF (1983) Induction of T-Cell Maturation by a Cloned Line of Thymic Epithelium (TEPI) 10.1073/pnas.80.19.6005. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 80: 6005–6009.
27. Pongracz JE, Parmell SM, Jones T, Anderson G, EJ.J (2006) Overexpression of ICAT highlights a role for catenin-mediated canonical Wnt signalling in early T cell development. *Eur J Immunol* 36: 2376–2383.
28. Friedl P, Gilmour D (2009) Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10: 445–457.
29. Hiripi L, Negre D, Cosset FL, Kvell K, Czompoly T, et al. Transgenic rabbit production with simian immunodeficiency virus-derived lentiviral vector. *Transgenic Res*.
30. Kvell K, Nguyen TH, Salmon P, Glauser F, Werner-Favre C, et al. (2005) Transduction of CpG DNA-stimulated primary human B cells with bicistronic lentivectors. *Mol Ther* 12: 892–899.

kvell.krisztian\_95\_23

## Review Article

# Blurring Borders: Innate Immunity with Adaptive Features

K. Kvell,<sup>1</sup> EL. Cooper,<sup>2</sup> P. Engelmann,<sup>1</sup> J. Bovari,<sup>1</sup> and P. Nemeth<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Immunology and Biotechnology, Faculty of Medicine, University of Pécs, 7624 Pécs, Hungary

<sup>2</sup>Laboratory of Comparative Neuroimmunology, Department of Neurobiology, David Geffen School of Medicine at UCLA, University of California, Los Angeles, CA 90095-1763, USA

Correspondence should be addressed to P. Nemeth, peter.nemeth@aok.pte.hu

Received 26 June 2007; Accepted 5 November 2007

Recommended by Yasunobu Yoshikai

Adaptive immunity has often been considered the penultimate of immune capacities. That system is now being deconstructed to encompass less stringent rules that govern its initiation, actual effector activity, and ambivalent results. Expanding the repertoire of innate immunity found in all invertebrates has greatly facilitated the relaxation of convictions concerning what actually constitutes innate and adaptive immunity. Two animal models, incidentally not on the line of chordate evolution (*C. elegans* and *Drosophila*), have contributed enormously to defining homology. The characteristics of specificity and memory and whether the antigen is pathogenic or nonpathogenic reveal considerable information on homology, thus deconstructing the more fundamentalist view. Senescence, cancer, and immunosuppression often associated with mammals that possess both innate and adaptive immunity also exist in invertebrates that only possess innate immunity. Strict definitions become blurred casting skepticism on the utility of creating rigid definitions of what innate and adaptive immunity are without considering overlaps.

Copyright © 2007 K. Kvell et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

## 1. INTRODUCTION: WHERE INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY CONVERGE

All multicellular animals (invertebrates and vertebrates) manage to keep self-integrity. Any attempt to answer questions concerning immune recognition must consider the universality of receptor-mediated responses. These may designate two forms: (1) rearranging clonally distributed antigen-specific receptors that distinguish between self and nonself according to classical Burnet hypothesis; and/or (2) pattern recognition receptors introduced by Janeway [1, 2]. The ideal immune system provides rapid and efficient responses, diverse repertoire of recognition, and effector molecules as well as specific memory on an individual level. In the self and nonself discrimination theory, the recognition receptors are central to immunity. However, a recently advanced hypothesis emphasizes that alarm signals have priority and initiate immune responses. These alarm danger signals released from the body's own cells are explained by the danger model of immunity. According to this model, immune cells must "decide" what poses harm to the body among self and nonself structures [3, 4]. The

two branches of vertebrate immunity (innate and adaptive) are dependent on each other. The innate immune system, responsible for the first encounter with a pathogen, can trigger adaptive immunity in case the initial response is ineffective. Both arms interact with each other, via cell-cell interactions and soluble factors maintaining a physiological steady state [5].

With this in mind, we felt compelled to clarify and extend what seems to be the blurring or masking of certain immunological characteristics of invertebrates and vertebrates [6–8]. To do this, we first define the general features of innate and adaptive immunities. Innate immunity is considered to be natural, nonspecific, nonanticipatory, and nonclonal but germ-line encoded; whereas adaptive immunity is indeed specific, anticipatory, clonal, and somatic. Then, we discuss the blurring of vertebrate and invertebrate immunological characteristics in the following sections: (1) a preface to adaptive immunity; (2) senescence, cancer, and immunosuppressive viruses; (3) invertebrate immunological memory triggered by nonpathogenic stimuli; (4) the dawn of adaptive immunity; and (5) perspectives on innate and adaptive immunity.

## 2. A PREFACE TO ADAPTIVE IMMUNITY

### 2.1. *Products of eons*

Ancient innate immunity-related functions like phagocytosis and cytokine production (i.e., IL-1 and TNF) were already developed 700 million years ago in sponges and higher aquatic invertebrates (i.e., starfish). These fundamental functions remained unaltered during phylogenesis. A major evolutionary step happened 500 million years ago when fish developed jaws accompanied by evolution of the gut associated immune system. This system was fundamental to providing the genetic material required for recombination and mutation to produce variability and diversity of proteins (i.e., immunoglobulins). This system also enabled the occurrence of a wide spectrum of antigen-presenting proteins like the major histocompatibility complex (MHC). These MHC molecules developed from a primordial molecule over 300 million years ago [9].

### 2.2. *Interspecies borders*

A genetically colorful background is generally considered to be advantageous for species in their constant adaptation to the neighboring environment. On the other hand, for a suddenly emerging costly macroscopic function like adaptive immunity, working with clonally distributed receptors, intraspecies genetic backcrosses can make survival difficult. Therefore, in such cases, interspecies borders may help the genetic solidification of evolutionarily novel characteristics. However, drawing interspecies borders is not always easy as often seen in cases of hybridogenesis with certain invertebrate arthropods or even with vertebrate fish and amphibian species [10–12].

### 2.3. *Lymphocyte receptors: survival of the fittest molecule*

In the case of invertebrate organisms, species survival is maintained at the population level, which is risky for individuals. Whenever a new pathogen takes its toll, the remaining individuals are spared because they are more resistant than others. Such differences are genetically encoded [13]. However, for vertebrates, the surviving strategy is quite different. Vertebrates have a more complex immune system that generates a practically indefinite pool of recognition molecules, each present as a single cell clone. From this array of cells, those that provide better adaptation to various environments are selected in a fashion quite similar to macroscopic evolution. Cells that meet the requirements in this tough selection survive and proliferate. Such selection occurs every time a new pathogen attacks a vertebrate and the winners of this quick intercellular evolution are selected and propagated quickly enough to hunt down and neutralize the pathogen in the host organism [14].

### 2.4. *Aspects of immunological ecology and evolution*

Ecological immunology is a young but increasing science that examines causes and consequences of changes in immune

function in the context of evolution and of ecology. Millions of invertebrate species depend exclusively on using innate immunity, in contrast to the only 45 000 vertebrate species that employ an additional acquired immune system. Regardless of this major distinction, most studies of ecological immunology discuss only vertebrates. Nevertheless, insect immunity might be more specific and similar to vertebrate immunity than previously thought [15–17].

An explanation to why an anticipatory immune system employing clonally distributed receptors has not developed in invertebrates may be provided by immunological ecology. Highly developed organisms tend to be large in size. Since the size of individual cells does not show significant interspecies variances, being larger means having more cells. Adaptive immunity works with a huge number of recognition molecules distributed in a clonal pattern. Therefore, only highly developed organisms can afford to run such a costly immune system; otherwise costs would always outweigh benefits. It seems that having huge and complex communities of cells not only demands a highly effective adaptive immune system, but actually provides its basic framework in order to exist [18, 19].

## 3. SENESCENCE, CANCER, AND IMMUNOSUPPRESSIVE VIRUSES

### 3.1. *Is senescence relevant to understanding immunity?*

Senescence and age-related research is a promising approach that discovers revolutionary data. Immunological senescence of vertebrate adaptive immunity is a process widely accepted by most immunologists. This is, however, less evident when thinking in terms of invertebrate innate immunity. However, this will likely change in the near future as there is accumulating evidence of senescence and more specifically immunological senescence in invertebrate species.

Morphological features of the aging process (senescence) have been recognized for many years in invertebrates. For example, when earthworms are maintained for long periods in the laboratory, a progressive decrease in size reminiscent of degeneration and a kind of wasting syndrome occur [20]. Congo red staining indicates the presence of amyloid in every organ-system as a diagnostic feature of aging [21]. With invertebrates and from a comparative viewpoint, there are examples of (1) rapid senescence and sudden death (progeria); (2) gradual senescence with definite life span; (3) negligible senescence; and (4) genetic influence on life span, mortality rates, and age-related diseases [22]. Increased activation of the immune system is a general characteristic that accompanies senescence in animals, including mammals and certain invertebrates. Gene expression analyses show that some of the most remarkable transcriptional changes that happen during aging are related to immunity. As a consequence, the use of invertebrate model organisms is highly desirable.

During senescence, *Drosophila melanogaster* expresses increasing levels of numerous antimicrobial peptides if exposed to septic bacterial infections, but not in response to bacterial extracts [23]. Mortality factor on chromosome 4 (MORF4)

is known to initiate senescence in a number of cell lines. MORF-related gene on chromosome 15 (MRG15 expressed from yeast to humans) has been shown to be extremely conserved. The significant effect of MRG1 (the *Caenorhabditis elegans* ortholog of the above MRG15) in the aging process has also been demonstrated [24]. The DAF family of transcription factors supports its critical importance in the control of aging (immunosenescence) in this nematode model. The DAF-2 mediated insulin signaling pathway is a key cascade that influences senescence in *Caenorhabditis elegans* and this function seems to be evolutionarily conserved: the DAF pathway also affects aging in *Drosophila melanogaster* and rodents [25]. Innate immune functions in *Caenorhabditis elegans* are also regulated by the TGF $\beta$ -like and the p38 MAPK pathways. The requirement of the DAF-2 cascade in regulating senescence and immunity raises molecular-level linkage of these processes [26].

### 3.2. Cancer and immunosuppressive viruses in invertebrates

#### 3.2.1. Cancer development

Cancer development has often been addressed in vertebrate species especially its relation with adaptive immunity. However, invertebrates also develop tumors in response to environmental carcinogens. Studying cancer development in species possessing innate immunity alone is a very promising field of research and may highlight adaptivelike functions present in invertebrates.

Mussels are vulnerable to several environmental toxicants and carcinogens. DNA sequence alignment of the *Mytilus edulis* homologue of vertebrate *ras* and p53 demonstrates extreme evolutionary conservatism in active domains, including four mutational hot spots [27]. Cases of transmissible sarcoma caused by environmental carcinogens (i.e., chlor-dane) in the soft-shell clam *Mya arenaria* have also been reported [28–30].

*Drosophila* offers a unique platform for the rapid identification and characterization of tumor suppressor genes, many of which have mammalian homologues. Genomewide microarray analysis of *Drosophila* brain tumor caused by the disfunction of the *Brat* tumor suppressor gene has identified over three hundred associated genes. Sixty of these sequences show homology to existing mammalian genes involved in tumor development [31]. As in human cancers, loss of heterozygosity can lead to tumor formation as reported in the case of the warts (*wts*) sequence. The *wts* sequence was identified by the massive overgrowth of clones homozygous for *wts* deletion [32, 33]. Similarly, mutations of the fat locus cause hyperplastic overgrowth of the imaginal discs. The affected protein product is a relative of cadherins, which are known to play an important role in human tumor suppression [34].

#### 3.2.2. Immunosuppressive viruses

For those who believe in the orthodox split between innate and adaptive immunities in terms of characteristics, it

is perhaps difficult to accept the existence of viruses that specifically suppress the cellular components of innate immunity. Nevertheless, as proved by experimental data, innate immunity-specific immunosuppressive viruses exist. *Cotesia congregata* is a wasp that injects its eggs into the host caterpillar *Manduca sexta*. However, in this particular host-parasite relation, the presence of a third partner is necessary for successful parasitism: a bracovirus. The *C. congregata* bracovirus (CcBV) is injected simultaneously with the wasp eggs. Expression of viral genes hijacks the caterpillar's immune defense responses, which favors the survival and development of adult parasitoid wasps [63, 64]. This parasitoid wasp is known to take advantage of yet another virus in a similar fashion, a polydnavirus. Polydnaviruses (PDVs) also suppress the immune system of the host and allow the juvenile parasitoids to develop without being encapsulated by host hemocytes [65]. In invertebrates, the ambivalent relation of viruses and their hosts is further complicated by presence of both specific (RNA interference-mediated) and non-specific (interferon-mediated) antiviral responses supporting the *blurring* of immunological functions [66].

## 4. INVERTEBRATE IMMUNOLOGICAL MEMORY TRIGGERED BY NONPATHOGENIC STIMULI

### 4.1. Protostomes

Numerous examples have been presented of animal immune responses that may develop following challenge by pathogenic organisms or nonpathogenic stimuli [8]. Here, we refer to reports previously neglected thus widening the scope of definitions of what may trigger invertebrate memory and further adaptive immunity-related features (Table 1). Most evidence concerning the evolution of innate immunity has been derived from two ecdysozoan species: *C. elegans* and *Drosophila*. In contrast, the lophotrochozoan systems share some distinct differences; mollusks may have managed immunological defense in a special manner similar to the annelids including earthworms [67] (Figure 1).

Early invertebrates present numerous examples of non-self recognition. Two classes of receptors with Ig-like domains have been identified in marine sponges: receptor tyrosine kinases and adhesion molecules. The expression of these molecules is known to be upregulated following a grafting process [35, 36, 68].

Various worm species have been used in tissue transplantation experiments. The marine nemertean ribbon worm *Lineus* readily rejects xenogeneic grafts revealing a memory component that lasts for three months [39–42]. In annelids (earthworms and leeches), accelerated rejection, weak specificity and short-term “memory” mediated by the cellular immune system have been reported [43–45, 69–74]. Molluscs are also capable of recognizing tissue alloantigens as demonstrated in the terrestrial slug *Incilaria fruhstorferi* after exchanging dorsal skin-allografts: immune cells infiltrated the grafts [46].

Recent knowledge of invertebrate innate immunity is mainly based on molecular data of dipteran insect species; however there is no recent information available about tissue

TABLE 1: Invertebrates exhibiting induction, specificity, and/or immunological memory in the nonpathogenic context of first and second challenges with transplants (n.a.: not analyzed).

Species	Challenge	Specificity	Memory	References
<b>Porifera</b>				
<i>C. diffusa</i>	Tissue (allograft)	+	+	Smith and Hildemann, 1986 [35]
<i>G. cydonium</i>	transplantation	+	n.a.	Müller et al., 1999 [36]
<b>Cnidaria</b>				
<i>E. stricta</i>	Colonial contact/allograft,	+	n.a.	Theodor, 1970 [37]
<i>M. verrucosa</i>	xenograft	+	+	Hildemann et al., 1977 [38]
<b>Nemertea</b>				
<i>L. ruber</i>	Tissue (allograft, xenograft)	+	+	Bierne and Langlet, 1974 [39];
<i>L. lacteus</i>	transplantation			Langlet and Bierne, 1975 [40]; 1982 [41]; 1984 [42]
<b>Annelida</b>				
Earthworms <i>L. terrestris</i> <i>E. fetida</i>	Tissue (allograft, xenograft)	+	+	Cooper, 1969 [43]; Cooper and Roch, 1986 [44]
Leeches <i>H. medicinalis</i> <i>G. complanata</i>	Tissue (allograft, xenograft)	+	+	Tettamanti et al., 2003 [45]
<b>Mollusca</b>				
<i>I. fruhstorferi</i>	Tissue (allograft)	+	n.a.	Yamaguchi et al., 1999 [46]
<b>Arthropoda</b>				
<i>P. americana</i> <i>B. orientalis</i>	Tissue (allograft, xenograft)	+	+	Hartmann and Karp, 1989 [47]; Karp and Meade, 1993 [48]
<b>Echinodermata</b>				
<i>S. purpuratus</i> <i>L. pictus</i>	Tissue (allograft)	+	–	Coffaro and Hinegardner, 1977 [49]
<i>D. imbricata</i>	transplantation	+	+	Karp and Hildemann, 1976 [50]
<b>Tunicata</b>				
<i>B. schlosseri</i>	Colonial contact/allograft	+	n.a.	Rinkevich et al., 1998 [51]; Scofield et al., 1982 [52];
<i>S. plicata</i>		+	+	Raftos et al., 1987 [53]; 1988 [54]

allorecognition in these model organisms. However, several studies have indicated that the cockroach can respond to integumentary xenografts and effectively discriminate between self and allogeneic tissues [47, 48].

#### 4.2. Deuterostomes

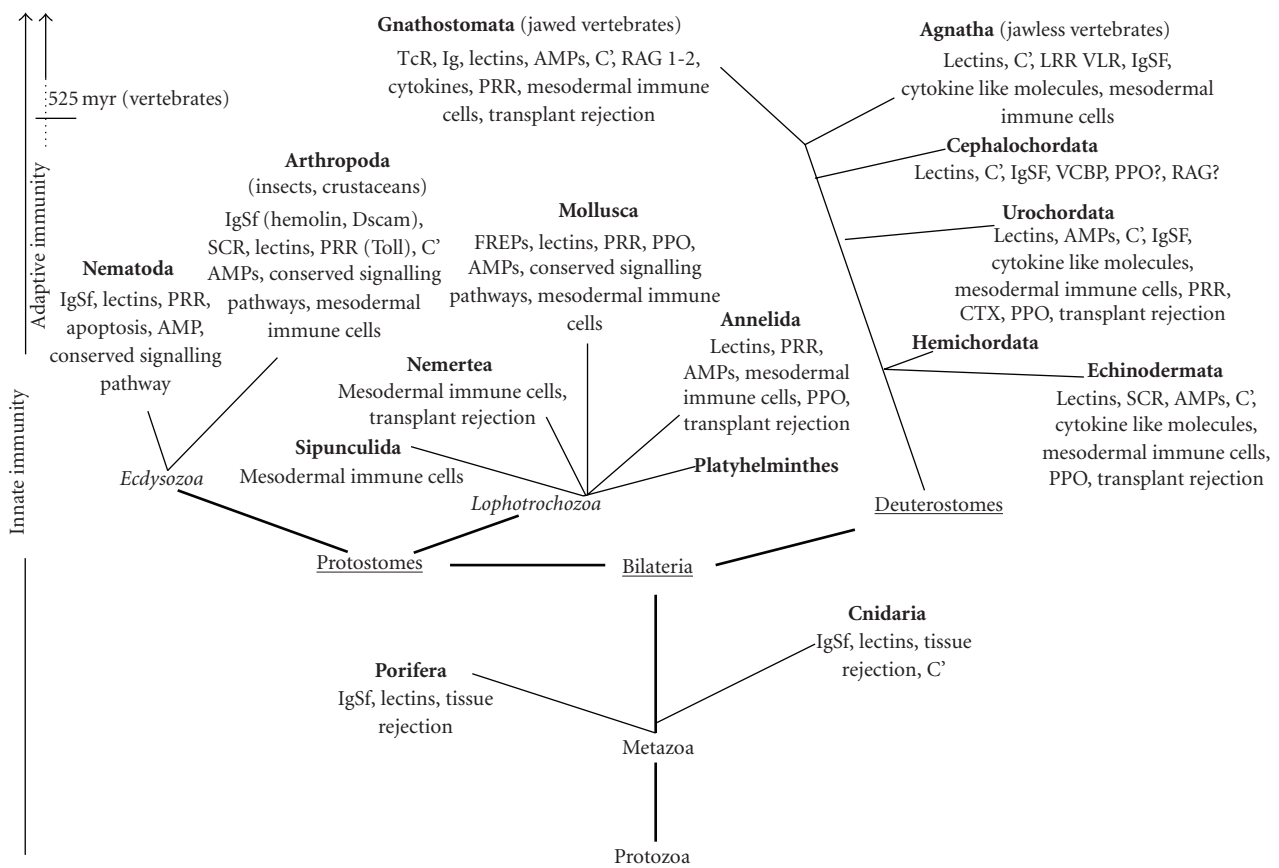
Sea urchins and sea stars exhibit immune responses against grafted tissues similar to those found in vertebrates [49, 50]. The responses of the urochordates *Styela plicata* and *Botryllus schlosseri* to tunic grafts confirm the existence of a sensitive histocompatibility system. Screening for genes differentially expressed during allorecognition in *Botryllus schlosseri* has identified a gene encoding a transmembrane protein showing close similarity to CD94/NKR-P1. The allorecognition of *B. schlosseri* is controlled by an ancient MHC-like system (called Fu/HC) [51, 53, 54, 75–78].

Since the complete genome of the urochordate *Ciona intestinalis* has been sequenced, it allows for the rapid identification of early evolutionary roots of adaptive immunity. In the hemocytes of *C. intestinalis*, certain adaptive-immunity homologous ESTs have been identified including vWF-like

(von Willebrand factor-like), distant homologues of type I interferon (IFN) receptors, and C6-like (complement 6-like) elements [79, 80]. Moreover, genes that encode molecules with membrane receptor features of the immunoglobulin superfamily (IgSf) have also been reported [81].

#### 5. THE DAWN OF ADAPTIVE IMMUNITY

The emergence of adaptive immunity was not a sudden event; its far-reaching evolutionary roots are currently under investigation by modern molecular biological methods. Genomewide sequence analysis of invertebrates has focused on the genes of innate immunity including complement components, Toll-like receptors, and those involved in intracellular signal transduction of immune responses. Assessment of extracellular C-type lectins, immunoglobulin domains, intracellular immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs (ITIMs), and immunoreceptor tyrosine-based activation motifs (ITAMs) (together with their associated signal transduction molecules) suggests that activating and inhibitory receptors have an early evolutionary origin [82].



AMP: antimicrobial peptides

C': complement pathway elements

CTX: cortical thymocytemarker in *Xenopus*

Dscam: drosophila homolog for Down syndrome cell adhesion molecule

FREPs: fibrinogen related peptides

IgSF: immunoglobulin superfamily

LRR VLR: variable lymphocyte receptors with leucine rich repeats

PPO: prophenoloxidase cascade

PRR: pattern recognition receptors

RAG: recombination-activating genes

SCR: scavenger receptors

VCBP: variable chitin binding proteins

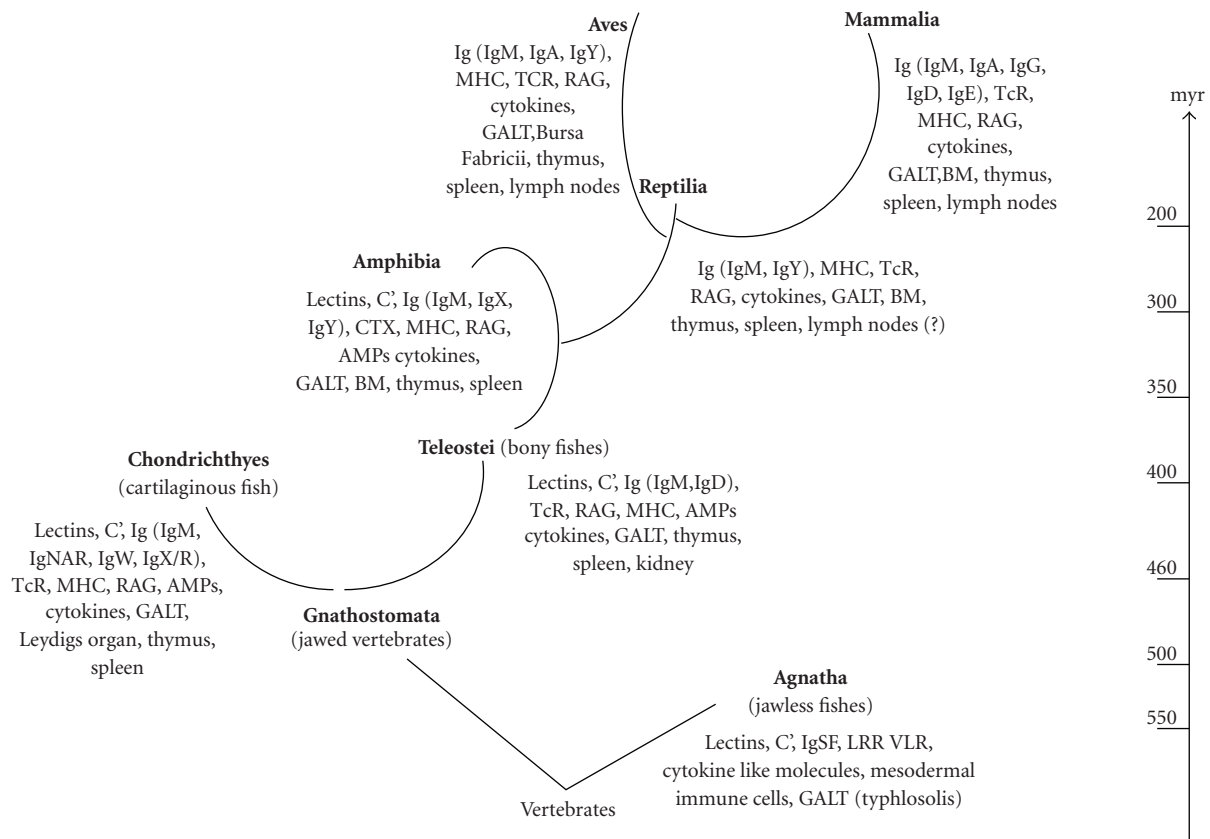
TCR: T cell receptor

FIGURE 1: Phylogenetic tree of the animal kingdom highlighting the evolution of key immunological elements. Two arrows on the left side of Figure 1 indicate possible appearance of the two branches of immunity. Innate immunity may be observed along the entire animal kingdom. Traditionally accepted adaptive immunity appeared only in vertebrates, while certain adaptive immune mechanisms may have appeared early at the level of arthropods and molluscs illustrated by dots (below the arrow).

After decades of anticipation, the ancestors of some cytokines—soluble intercellular signaling molecules that form a complex network for the regulation of immunity—have recently been identified. In vertebrates, helical cytokines include IL2, IL6, INF  $\alpha$ -1, and GM-CSF. Malagoli et al. have identified a putative helical cytokine in *Drosophila melanogaster* by elaborate bioinformatics transcriptome analysis. It is very promising that transcription from this homologue is upregulated in parallel with the known antimicrobial factors defensin and cecropin A1 following Gram- or Gram+ challenge [83, 84]. Similarly, Söderhäll et al. have identified a prokineticin (PK) domain in astakine, an endogenous cytokine-like factor from the freshwater crayfish *Pacifastacus leniusculus* by mass spectrometry and PCR using degenerate primers. An astakine homologue has also been identified in the shrimp *Penaeus monodon*. In vertebrates,

PK domains direct angiogenic growth. It has been demonstrated that injections of recombinant astakine actively influence differentiation and growth of hemopoietic stem cells in vivo [85].

It is a notable observation that even our most distant vertebrate relatives, jawless fish (hagfish, lamprey), have an adaptivelike immune system. It operates by means of clonally distributed leucine-rich repeat (LRR) receptors (similar to Toll-like receptors) using a novel mechanism of gene rearrangement other than RAG. These LRR modules constitute the variable lymphocyte receptors (VLRs). Computer-assisted prediction suggests a repertoire of approximately  $10^{14}$  unique VLR receptors [86–89]. In response to the results described above, one suggestion involves the use of a different terminology for vertebrates instead of “adaptive” or “acquired” immune system: AIS or antibody-based immune



AMP: antimicrobial peptides

C': complement pathway elements

Ig: immunoglobulin

CTX: cortical thymocyte marker in *Xenopus*

LRR VLR: variable lymphocyte receptors with leucine rich repeats

MHC: major histocompatibility complex

GALT: gut associated lymphoid tissue

BM: bone marrow

NAR: new ("nurse shark") antigen receptor

RAG: recombination activating genes

TCR: T cell receptor

FIGURE 2: Evolution of molecular and histological structures of the vertebrate immune system. Regarding lymphatic tissues, the thymus, and spleen appeared early in fishes, while lymph-filtering lymph nodes are observed only in birds and mammals. Among the development of various immunoglobulin isotypes, IgD is expressed in bony fishes, later only mammals are using this B-cell receptor [55].

system [90]. Recent studies performed in noncanonic invertebrate model-species indicate that the tracks of adaptive immunity may be much deeper than previously suggested, referring to adaptivelike immunological functions present in invertebrates [91].

## 6. PERSPECTIVES ON INNATE AND ADAPTIVE IMMUNITY

According to the orthodox view of phylogenetic development, immunity has reached its zenith with the emergence of the adaptive immune system (or AIS) (Figure 2). Consequently, we tend to be influenced by anthropocentric views and overlook how other highly developed organisms manage to live in hostile environments [61]. As more recent data have become available regarding nontraditional animal models, it has been suggested that the emergence of adaptive immunity is perhaps not the culmination of the evolu-

tion of immunity, but simply a successful alternative to using innate immunity alone [92]. For millions of years, many species could keep up in the continuous arms race between pathogen and host called coevolution without the surveillance of adaptive immunity [93]. The complexity of biology should never be underestimated as it turns out that those animals lacking RAG-dependent adaptive immunity can make up for an equal amount of diversity using highly variable elements of innate immunity (FREPs, DsCAM, SRCRs) finally exhibiting adaptive features [59, 92–94]. On the other hand, in vertebrates, adaptive immunity often simply serves as a sophisticated targeting device that recognizes and then processes the antigen but finally leaves the messy job of actually clearing up pathogens to the immense capacity of innate immunity. Therefore, once again we see that borders are *blurring* and the strict distinction between innate and adaptive immunities might need revision (Figure 3).



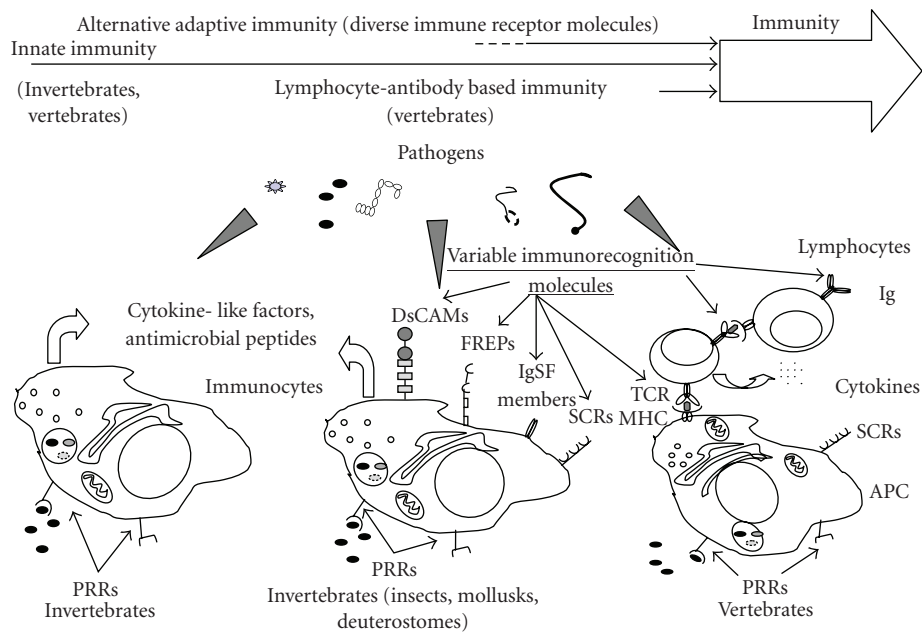


FIGURE 3: Schematic representation of innate and adaptive immune feature development in animals. All immune cells express nonspecific receptors, for example, pattern recognition receptors that recognize pathogen associated molecular patterns (PAMPs). Several clusters of innate receptors are conserved from plants to humans and are essential components in the defense of self-integrity. Immune cells of invertebrates also express various scavenger receptorlike proteins (Croquemort, SCRs) [37, 38, 52, 56, 57], immunoglobulin superfamily members (hemolin, DsCAM) [58, 59], and fibrinogen-related peptides (FREPs) [60]; all involved in immune functions (eliminating apoptotic cells, parasites, etc.). Invertebrate immune systems also exhibit receptors with high diversity involved in immune functions: FREPs, SCRs, and DsCAMs have extreme individual variability [60–62] like vertebrate adaptive immune recognition molecules (Ig, TCR).

## REFERENCES

- [1] F. M. Burnet, *The Clonal Selection Theory of Acquired Immunity*, Vanderbilt University Press, Nashville, Tenn, USA, 1959.
- [2] C. A. Janeway Jr., “The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self,” *Immunology Today*, vol. 13, no. 1, pp. 11–16, 1992.
- [3] P. Matzinger, “The danger model in its historical context,” *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 54, no. 1-2, pp. 4–9, 2001.
- [4] P. Matzinger, “Tolerance, danger, and the extended family,” *Annual Review of Immunology*, vol. 12, pp. 991–1045, 1994.
- [5] C. Hörner, A. Bouchon, A. Bierhaus, et al., “Role of the innate immune response in sepsis,” *Der Anaesthetist*, vol. 53, no. 1, pp. 10–28, 2004.
- [6] E. L. Cooper, B. Rinkevich, G. Uhlenbruck, and P. Valembois, “Invertebrate immunity: another viewpoint,” *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 35, no. 3, pp. 247–266, 1992.
- [7] T. J. Little, D. Hultmark, and A. F. Read, “Invertebrate immunity and the limits of mechanistic immunology,” *Nature Immunology*, vol. 6, no. 7, pp. 651–654, 2005.
- [8] J. Kurtz, “Specific memory within innate immune systems,” *Trends in Immunology*, vol. 26, no. 4, pp. 186–192, 2005.
- [9] G. G. Petrányi, “The complexity of immune and alloimmune response,” *Transplant Immunology*, vol. 10, no. 2-3, pp. 91–100, 2002.
- [10] S. H. Cahan and S. B. Vinson, “Reproductive division of labor between hybrid and nonhybrid offspring in a fire ant hybrid zone,” *Evolution*, vol. 57, no. 7, pp. 1562–1570, 2003.
- [11] K. Saitoh, I.-S. Kim, and E.-H. Lee, “Mitochondrial gene introgression between spined loaches via hybridogenesis,” *Zoological Science*, vol. 21, no. 7, pp. 795–798, 2004.
- [12] D. S. Schmeller, A. Seitz, A. Crivelli, and M. Veith, “Crossing species’ range borders: interspecies gene exchange mediated by hybridogenesis,” *Proceedings of the Royal Society B*, vol. 272, no. 1572, pp. 1625–1631, 2005.
- [13] A. L. Hughes, “Genomic catastrophism and the origin of vertebrate immunity,” *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, vol. 47, no. 6, pp. 347–353, 1999.
- [14] A. L. Hughes, “Natural selection and the diversification of vertebrate immune effectors,” *Immunological Reviews*, vol. 190, no. 1, pp. 161–168, 2002.
- [15] J. Rolff and M. T. Siva-Jothy, “Invertebrate ecological immunology,” *Science*, vol. 301, no. 5632, pp. 472–475, 2003.
- [16] J. Kurtz, I. T. van der Veen, and J. J. Ryder, “Ecological immunity of arthropods—a thread of Ariadne?” *Trends in Ecology & Evolution*, vol. 17, no. 5, pp. 204–205, 2002.
- [17] P. Schmid-Hempel, “Evolutionary ecology of insect immune defenses,” *Annual Review of Entomology*, vol. 50, pp. 529–551, 2005.
- [18] J. Klein, “Homology between immune responses in vertebrates and invertebrates: does it exist?” *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 46, no. 6, pp. 558–564, 1997.
- [19] C. Vogel and C. Chothia, “Protein family expansions and biological complexity,” *PLoS Computational Biology*, vol. 2, no. 5, p. e48, 2006.
- [20] E. L. Cooper and B. S. Baculi, “Degenerative changes in the annelid, *Lumbricus terrestris*,” *Journals of Gerontology*, vol. 23, no. 3, pp. 375–381, 1968.

- [21] G. Romhányi, "Selective differentiation between amyloid and connective tissue structures based on the collagen specific topo-optical staining reaction with Congo red," *Virchows Archiv*, vol. 354, no. 3, pp. 209–222, 1971.
- [22] E. L. Cooper, "Invertebrates can tell us something about senescence," *Aging Clinical and Experimental Research*, vol. 6, no. 1, pp. 5–23, 1994.
- [23] B. DeVeale, T. Brummel, and L. Seroude, "Immunity and aging: the enemy within?" *Aging Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 195–208, 2004.
- [24] A. Olgun, T. Aleksenko, O. M. Pereira-Smith, and D. K. Vasilatis, "Functional analysis of MRG-1: the ortholog of human MRG15 in *Caenorhabditis elegans*," *Journals of Gerontology A*, vol. 60, no. 5, pp. 543–548, 2005.
- [25] M. E. Giannakou, M. Goss, J. Jacobson, G. Vinti, S. J. Leever, and L. Partridge, "Dynamics of the action of *dFOXO* on adult mortality in *Drosophila*," *Aging Cell*, vol. 6, no. 4, pp. 429–438, 2007.
- [26] C. L. Kurz and M.-W. Tan, "Regulation of aging and innate immunity in *C. elegans*," *Aging Cell*, vol. 3, no. 4, pp. 185–193, 2004.
- [27] C. M. Ciocan and J. M. Rotchell, "Conservation of cancer genes in the marine invertebrate *Mytilus edulis*," *Environmental Science and Technology*, vol. 39, no. 9, pp. 3029–3033, 2005.
- [28] D. J. Christensen, C. A. Farley, and F. G. Kern, "Epizootic neoplasms in the clam *Macoma balthica* (L.) from Chesapeake Bay," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 52, no. 6, pp. 1739–1749, 1974.
- [29] C. A. Farley, D. L. Plutschak, and R. F. Scott, "Epizootiology and distribution of transmissible sarcoma in Maryland soft-shell clams, *Mya arenaria*, 1984–1988," *Environmental Health Perspectives*, vol. 90, pp. 35–41, 1991.
- [30] C. F. Dungan, R. M. Hamilton, K. L. Hudson, C. B. McCollough, and K. S. Reece, "Two epizootic diseases in Chesapeake Bay commercial clams, *Mya arenaria* and *Togelus plebeius*," *Diseases of Aquatic Organisms*, vol. 50, no. 1, pp. 67–78, 2002.
- [31] T. Loop, R. Leemans, U. Stiefel, et al., "Transcriptional signature of an adult brain tumor in *Drosophila*," *BMC Genomics*, vol. 5, no. 1, p. 24, 2004.
- [32] P. J. Bryant, K. L. Watson, R. W. Justice, and D. F. Woods, "Tumor suppressor genes encoding proteins required for cell interactions and signal transduction in *Drosophila*," *Development*, vol. 119, pp. 239–249, 1993.
- [33] E. Gateff, J. Wismar, N. Habtemichael, et al., "Functional analysis of *Drosophila* developmental genes instrumental in tumor suppression," *In Vivo*, vol. 10, no. 2, pp. 211–216, 1996.
- [34] K. L. Watson, R. W. Justice, and P. J. Bryant, "*Drosophila* in cancer research: the first fifty tumor suppressor genes," *Journal of Cell Science*, vol. 18, pp. 19–33, 1994.
- [35] L. C. Smith and W. H. Hildemann, "Allograft rejection, autograft fusion and inflammatory responses to injury in *Callyspongia diffusa* (Porifera; Demospongia)," *Proceedings of the Royal Society of London Series B*, vol. 226, no. 1245, pp. 445–464, 1986.
- [36] W. E. G. Müller, B. Blumbach, and I. M. Müller, "Evolution of the innate and adaptive immune systems: relationships between potential immune molecules in the lowest metazoan phylum (Porifera) and those in vertebrates," *Transplantation*, vol. 68, no. 9, pp. 1215–1227, 1999.
- [37] J. L. Theodor, "Distinction between "self" and "not-self" in lower invertebrates," *Nature*, vol. 227, no. 259, pp. 690–692, 1970.
- [38] W. H. Hildemann, R. L. Raison, G. Cheung, C. J. Hull, L. Akaka, J. Okamoto, et al., "Immunological specificity and memory in a scleractinian coral," *Nature*, vol. 270, no. 5634, pp. 219–223, 1977.
- [39] J. Bierne and C. Langlet, "Studies on graft immunity in nemerteans of the genus *Lineus* Study of the primary reaction to heterospecies transplantation," *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, vol. 278, no. 10, pp. 1445–1447, 1974.
- [40] C. Langlet and J. Bierne, "Transplantation immunity in nemerteans of the genus *lineus* Accelerated rejection of second heterospecific incompatible grafts," *Comptes Rendus Hebdomadaires Des Seances De L'Academie Des Sciences. Serie D: Sciences Naturelles*, vol. 281, no. 9, pp. 595–598, 1975.
- [41] C. Langlet and J. Bierne, "Immune characteristics of graft rejection in nemerteans of the genus *Lineus*," *European Journal of Immunology*, vol. 12, no. 9, pp. 705–708, 1982.
- [42] C. Langlet and J. Bierne, "Immunocompetent cells requisite for graft rejection in *Lineus* (invertebrata, nemertea)," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 8, no. 3, pp. 547–557, 1984.
- [43] E. L. Cooper, "Specific tissue graft rejection in earthworms," *Science*, vol. 166, no. 3911, pp. 1414–1415, 1969.
- [44] E. L. Cooper and P. Roch, "Earthworm leukocyte interactions during early stages of graft rejection," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 232, no. 1, pp. 67–72, 1984.
- [45] G. Tettamanti, A. Grimaldi, R. Ferrarese, et al., "Leech responses to tissue transplantation," *Tissue and Cell*, vol. 35, no. 3, pp. 199–212, 2003.
- [46] K. Yamaguchi, E. Furuta, and H. Nakamura, "Chronic skin allograft rejection in terrestrial slugs," *Zoological Science*, vol. 16, no. 3, pp. 485–495, 1999.
- [47] R. S. Hartman and R. D. Karp, "Short-term immunologic memory in the allograft response of the American cockroach, *Periplaneta americana*," *Transplantation*, vol. 47, no. 5, pp. 920–922, 1989.
- [48] R. D. Karp and C. C. Meade, "Transplantation immunity in the American cockroach, *Periplaneta americana* the rejection of integumentary grafts from *Blatta orientalis*," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 17, no. 4, pp. 301–307, 1993.
- [49] K. A. Coffaro and R. T. Hinegardner, "Immune response in the sea urchin *Lytechinus pictus*," *Science*, vol. 197, no. 4311, pp. 1389–1390, 1977.
- [50] R. D. Karp and W. H. Hildemann, "Specific allograft reactivity in the sea star *Dermasterias imbricata*," *Transplantation*, vol. 22, no. 5, pp. 434–439, 1976.
- [51] B. Rinkevich, I. L. Weissman, and A. W. De Tomaso, "Transplantation of Fu/Hc-incompatible zooids in *Botryllus schlosseri* results in chimerism," *Biological Bulletin*, vol. 195, no. 2, pp. 98–106, 1998.
- [52] V. L. Scofield, J. M. Schlumpberger, L. A. West, and I. L. Weissman, "Protochordate allorecognition is controlled by a MHC-like gene system," *Nature*, vol. 295, no. 5849, pp. 499–502, 1982.
- [53] D. A. Raftos, N. N. Tait, and D. A. Briscoe, "Allograft rejection and alloimmune memory in the solitary urochordate, *Styela plicata*," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 11, no. 2, pp. 343–351, 1987.
- [54] D. A. Raftos, D. A. Briscoe, and N. N. Tait, "The mode of recognition of allogeneic tissue in the solitary urochordate *Styela plicata*," *Transplantation*, vol. 45, no. 6, pp. 1123–1126, 1988.

- [55] L. Du Pasquier and G. W. Litman, Eds., *Origin and Evolution of the Vertebrate Immune System*, Current Topics in Microbiology and Immunology, Springer, Heidelberg, Germany, 2000.
- [56] N. C. Franc, J.-L. Dimarcq, M. Lagueux, J. Hoffmann, and R. A. B. Ezekowitz, "Croquemort, a novel *Drosophila* hemocyte/macrophage receptor that recognizes apoptotic cells," *Immunity*, vol. 4, no. 5, pp. 431–443, 1996.
- [57] Z. Pancer, "Dynamic expression of multiple scavenger receptor cysteine-rich genes in coelomocytes of the purple sea urchin," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 97, no. 24, pp. 13156–13161, 2000.
- [58] F. L. Watson, R. Püttmann-Holgado, F. Thomas, et al., "Immunology: extensive diversity of Ig-superfamily proteins in the immune system of insects," *Science*, vol. 309, no. 5742, pp. 1874–1878, 2005.
- [59] S.-C. Sun, I. Lindstrom, H. G. Boman, I. Faye, and O. Schmidt, "Hemolin: an insect-immune protein belonging to the immunoglobulin superfamily," *Science*, vol. 250, no. 4988, pp. 1729–1732, 1990.
- [60] S.-M. Zhang and E. S. Loker, "The *FREP* gene family in the snail *Biomphalaria glabrata* additional members, and evidence consistent with alternative splicing and *FREP* retrosequences," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 27, no. 3, pp. 175–187, 2003.
- [61] M. F. Flajnik and L. Du Pasquier, "Evolution of innate and adaptive immunity: can we draw a line?" *Trends in Immunology*, vol. 25, no. 12, pp. 640–644, 2004.
- [62] S.-M. Zhang, C. M. Adema, T. B. Kepler, and E. S. Loker, "Diversification of Ig superfamily genes in an invertebrate," *Science*, vol. 305, no. 5681, pp. 251–254, 2004.
- [63] E. Espagne, V. Douris, G. Lalmanach, et al., "A virus essential for insect host-parasite interactions encodes cystatins," *Journal of Virology*, vol. 79, no. 15, pp. 9765–9776, 2005.
- [64] K. E. Amaya, S. Asgari, R. Jung, M. Hongskula, and N. E. Beckage, "Parasitization of *Manduca sexta* larvae by the parasitoid wasp *Cotesia congregata* induces an impaired host immune response," *Journal of Insect Physiology*, vol. 51, no. 5, pp. 505–512, 2005.
- [65] M. Bonvin, D. Marti, S. Wyder, D. Kojic, M. Annaheim, and B. Lanzrein, "Cloning, characterization and analysis by RNA interference of various genes of the *Chelonus inanitus* polydnavirus," *Journal of General Virology*, vol. 86, no. 4, pp. 973–983, 2005.
- [66] J. Robalino, T. C. Bartlett, R. W. Chapman, P. S. Gross, C. L. Browdy, and G. W. Warr, "Double-stranded RNA and antiviral immunity in marine shrimp: inducible host mechanisms and evidence for the evolution of viral counter-responses," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 31, no. 6, pp. 539–547, 2007.
- [67] E. S. Loker and C. J. Bayne, "Molecular studies of the molluscan response to digenean infection," in *Phylogenetic Perspectives on the Vertebrate Immune Systems*, G. Beck, M. Sungumaran, and E. L. Cooper, Eds., pp. 209–222, Kluwer Academic/Plenum, New York, NY, USA, 2001.
- [68] W. H. Hildemann, P. L. Jokiel, C. H. Bigger, and I. S. Johnston, "Allogeneic polymorphism and alloimmune memory in the coral, *Montipora verrucosa*," *Transplantation*, vol. 30, no. 4, pp. 297–301, 1980.
- [69] E. L. Cooper and P. Roch, "Second-set allograft responses in the earthworm *Lumbricus terrestris*. Kinetics and characteristics," *Transplantation*, vol. 41, no. 4, pp. 514–520, 1986.
- [70] R. K. Hostetter and E. L. Cooper, "Coelomocytes as effector cells in earthworm immunity," *Immunological Communications*, vol. 1, no. 2, pp. 155–183, 1972.
- [71] R. K. Hostetter and E. L. Cooper, "Cellular anamnesis in earthworms," *Cellular Immunology*, vol. 9, no. 3, pp. 384–392, 1973.
- [72] E. A. Stein and E. L. Cooper, "In vitro agglutinin production by earthworm leukocytes," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 12, no. 3, pp. 531–547, 1988.
- [73] E. L. Cooper, A. Cossarizza, M. M. Suzuki, et al., "Autogeneic but not allogeneic earthworm effector coelomocytes kill the mammalian tumor cell target K562," *Cellular Immunology*, vol. 166, no. 1, pp. 113–122, 1995.
- [74] A. Cossarizza, E. L. Cooper, M. M. Suzuki, et al., "Earthworm leukocytes that are not phagocytic and cross-react with several human epitopes can kill human tumor cell lines," *Experimental Cell Research*, vol. 224, no. 1, pp. 174–182, 1996.
- [75] D. A. Raftos, N. N. Tait, and D. A. Briscoe, "Cellular basis of allograft rejection in the solitary urochordate, *Styela plicata*," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 11, no. 4, pp. 713–725, 1987.
- [76] D. A. Raftos and E. L. Cooper, "Proliferation of lymphocyte-like cells from the solitary tunicate, *Styela clava*, in response to allogeneic stimuli," *Journal of Experimental Zoology*, vol. 260, no. 3, pp. 391–400, 1991.
- [77] Z. Pancer, E. L. Cooper, and W. E. G. Müller, "A tunicate (*Botryllus schlosseri*) cDNA reveals similarity to vertebrate antigen receptors," *Immunogenetics*, vol. 45, no. 1, pp. 69–72, 1996.
- [78] K. Khalaturin, M. Becker, B. Rinkevich, and T. C. G. Bosch, "Urochordates and the origin of natural killer cells: identification of a CD94/NKR-P1-related receptor in blood cells of *Botryllus*," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 100, no. 2, pp. 622–627, 2003.
- [79] T. Wakoh, M. Ikeda, R. Uchino, et al., "Identification of transcripts expressed preferentially in hemocytes of *Ciona intestinalis* that can be used as molecular markers," *DNA Research*, vol. 11, no. 5, pp. 345–352, 2004.
- [80] C. D. Krause and S. Pestka, "Evolution of the class 2 cytokines and receptors, and discovery of new friends and relatives," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 106, no. 3, pp. 299–346, 2005.
- [81] L. Du Pasquier, I. Zucchetti, and R. De Santis, "Immunoglobulin superfamily receptors in protochordates: before RAG time," *Immunological Reviews*, vol. 198, no. 1, pp. 233–248, 2004.
- [82] K. Azumi, R. De Santis, A. De Tomaso, et al., "Genomic analysis of immunity in a Urochordate and the emergence of the vertebrate immune system: "waiting for Godot"" *Immunogenetics*, vol. 55, no. 8, pp. 570–581, 2003.
- [83] D. Malagoli and E. Ottaviani, "Helical cytokines and invertebrate immunity: a new field of research," *Scandinavian Journal of Immunology*, vol. 66, no. 4, pp. 484–485, 2007.
- [84] D. Malagoli, D. Conklin, S. Sacchi, M. Mandrioli, and E. Ottaviani, "A putative helical cytokine functioning in innate immune signalling in *Drosophila melanogaster*," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, vol. 1770, no. 6, pp. 974–978, 2007.
- [85] I. Söderhäll, Y.-A. Kim, P. Jiravanichpaisal, S.-Y. Lee, and K. Söderhäll, "An ancient role for a prokineticin domain in invertebrate hematopoiesis," *Journal of Immunology*, vol. 174, no. 10, pp. 6153–6160, 2005.
- [86] Z. Pancer, C. T. Amemiya, G. R. A. Ehrhardt, J. Coitlin, G. L. Gartland, and M. D. Cooper, "Somatic diversification of variable lymphocyte receptors in the agnathan sea lamprey," *Nature*, vol. 430, no. 6996, pp. 174–180, 2004.

- [87] Z. Pancer, N. R. Saha, J. Kasamatsu, et al., "Variable lymphocyte receptors in hagfish," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 26, pp. 9224–9229, 2005.
- [88] J. P. Cannon, R. N. Haire, Z. Pancer, et al., "Variable domains and a VpreB-like molecule are present in a jawless vertebrate," *Immunogenetics*, vol. 56, no. 12, pp. 924–929, 2005.
- [89] M. N. Alder, I. B. Rogozin, L. M. Iyer, G. V. Glazko, M. D. Cooper, and Z. Pancer, "Diversity and function of adaptive immune receptors in a jawless vertebrate," *Science*, vol. 310, no. 5756, pp. 1970–1973, 2005.
- [90] J. Klein and N. Nikolaidis, "The descent of the antibody-based immune system by gradual evolution," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, no. 1, pp. 169–174, 2005.
- [91] J. J. Marchalonis, S. F. Schluter, R. M. Bernstein, and V. S. Hohman, "Antibodies of sharks: revolution and evolution," *Immunological Reviews*, vol. 166, pp. 103–122, 1998.
- [92] G. W. Litman, J. P. Cannon, and L. J. Dishaw, "Reconstructing immune phylogeny: new perspectives," *Nature Reviews Immunology*, vol. 5, no. 11, pp. 866–879, 2005.
- [93] E. L. Cooper, E. Kauschke, and A. Cossarizza, "Digging for innate immunity since Darwin and Metchnikoff," *BioEssays*, vol. 24, no. 4, pp. 319–333, 2002.
- [94] K. Khalturin, U. Kürn, N. Pinnow, and T. C. G. Bosch, "Towards a molecular code for individuality in the absence of MHC: screening for individually variable genes in the urochordate *Ciona intestinalis*," *Developmental & Comparative Immunology*, vol. 29, no. 9, pp. 759–773, 2005.